

Gudrian Ricardo Lopes de Almeida

**COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO, ANSIOLÍTICO E
ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELO
METILGLIOXAL, UMA TOXINA ENDÓGENA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências, da Universidade
Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do grau
de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz
Dafré

Florianópolis
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Gudrian Ricardo Lopes de Almeida

**COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO, ANSIOLÍTICO E
ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELO
METILGLIOXAL, UMA TOXINA ENDÓGENA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências, da Universidade
Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do grau
de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz
Dafré

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes de Almeida, Gudrian Ricardo
COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO, ANSIOLÍTICO E ALTERAÇÕES
NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELO METILGLIOXAL, UMA TOXINA
ENDÓGENA / Gudrian Ricardo Lopes de Almeida ; orientador,
Alcir Luiz Dafré - Florianópolis, SC, 2016.
81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Neurociências.

Inclui referências


1. Neurociências. 2. Depressão. 3. Ansiedade. 4.
Glutathione. 5. Metilglioxal. I. Dafré, Alcir Luiz. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. III. Título.

GUDRIAN RICARDO LOPES DE ALMEIDA

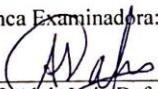
**“COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO,
ANSIOLÍTICO E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS
INDUZIDAS PELO METILGLIOXAL, UMA TOXINA
ENDÓGENA”**

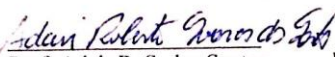
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 29 de agosto de 2016.

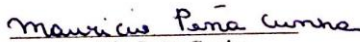

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Alcir Luiz Dafré
Orientador – UFSC


Prof. Adair R. S. dos Santos
Membro - UFSC


Profa. Manuella Pinto Kaster
Membro externo ao Programa


Dr. Mauricio Peña Cunha
Membro externo ao Programa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe e meu pai, dedicados as suas escolhas, portadores de amor incondicional e por toda a força que pode me ajudar nesse caminho.

Agradeço ao meu orientador, Alcir Luiz Dafré, grande exemplo de profissionalismo, por todos os ensinamentos, paciência e incentivo a mim. Obrigada por me mostrar como é ser apaixonado pela pesquisa.

Aos amigos do laboratório e da pós-graduação, tanto pelos ensinamentos que levarei comigo quanto pelas risadas que jamais esquecerei.

Aos professores da PPG em Neurociências pelos conhecimentos e exemplos passados durante o mestrado.

Aos amigos que diretamente ou indiretamente participaram desta fase da minha vida, obrigada pela paciência e apoio.

À CAPES pela bolsa de estudo, nível Mestrado.

RESUMO

O metilglioal (MG) é uma toxina endógena sintetizada em diversas vias metabólicas, sendo a glicólise a principal delas. O aumento nos níveis de MG foi associado a transtornos de humor, como a depressão e a ansiedade, além de ser considerado um dos principais agentes causais do envelhecimento e de doenças neurodegenerativas. Contudo, não se sabe quais são os mecanismos moleculares envolvidos na indução desses efeitos. Assim, no presente trabalho foram avaliados os efeitos comportamentais e neuroquímicos após administração via intraperitoneal (i.p.) aguda e repetida de MG, em camundongos Swiss fêmeas, com 3 meses de idade. Os animais que receberam MG tiveram um aumento de imobilidade no teste da suspensão da cauda (TSC), tanto 15 minutos (25 - 200 mg/kg) ou 4 h após uma única administração de MG (10 e 25 mg/kg). Administrações repetidas de MG (1 injeção diária por 6 dias consecutivos de 10 e 25 mg/kg, seguida do TSC 24 h após a última injeção) também levou a um aumento no tempo de imobilidade no TSC. Este efeito tipo-depressivo não pode ser atribuído a uma alteração na atividade locomotora dos animais, uma vez que esta não foi afetada no teste do campo aberto. O MG 10 mg/kg induziu um efeito ansiolítico no TCA, uma vez que o tempo no centro foi aumentado 4 h após o tratamento com MG, o que já havia sido relatado na literatura. Este efeito ansiolítico também foi observado no teste da caixa claro/escuro, onde os animais tratados com MG (25 mg/kg) permaneceram mais tempo na área clara 4 h após a administração de MG. Este mesmo efeito foi observado no tratamento com doses repetidas de MG. As análises bioquímicas revelaram que o tratamento com MG (10 e 25 mg/kg) não é capaz de alterar os níveis de glutathione, e a expressão das enzimas glutamato-cisteína ligase, glutathione redutase, glioxalase 1 e tioredoxina redutase no hipocampo, estriado e cortex cerebral, exceto pelo aumento da atividade TrxR no hipocampo. O comportamento do tipo-depressivo induzido pelo MG não foi encontrado em outros trabalhos com injeção intracerebroventricular e por períodos prolongados, entretanto os testes comportamentais de forma aguda (15 min e 4 h) e administrações repetidas foram bastante consistentes. O conhecido efeito ansiolítico foi confirmado pelos nossos dados experimentais, cujo mecanismo de ação parece envolver os receptores GABAA. O conjunto de dados, juntamente com aqueles apresentados por outros autores, confirmam que o MG está envolvido com a modulação de comportamentos relacionados a depressão e a ansiedade em roedores. Adicionalmente, este trabalho mostrou que o

MG não é capaz de alterar os parâmetros bioquímicos relacionados às defesas antioxidantes 4 h após a sua administração. As buscas por mecanismos de ação do MG ainda precisam ser investigadas em estudos futuros.

Palavras-chave: Metilglioxal; Depressão; Ansiedade; Glutathione; Glioxalase; Tiorredoxina.

ABSTRACT

Methylglyoxal (MG) is an endogenous toxin synthesized in several metabolic pathways, glycolysis is the main one. The increase in MG levels has been associated with mood disorders such as depression and anxiety, besides being one of the main causative agents of aging and neurodegenerative diseases. However, it is not known which are the molecular mechanisms involved in the induction of these effects. In the present study we evaluated the behavioral and neurochemical effects after intraperitoneal (i.p.) acute and repeated MG in Swiss female mice, 3 months old. The animals that received MG had an increased immobility time in the tail suspension test (TST) for both 15 minutes (25-200 mg / kg) or 4 h after a single administration of MG (10 and 25 mg / kg). Repeated administration of MG (1 injection daily for 6 consecutive days of 10 and 25 mg / kg, followed by the TSC 24 h after the last injection) also led to an increase in immobility time in the TST. Such depressant effect can not be attributed to a change in locomotor activity of the animals, since it was not affected in the open field test. The MG 10 mg / kg induced an anxiolytic effect on the OFT, since the time was increased in the center 4 h after MG treatment, which had already been reported in the literature. This anxiolytic effect was also observed in the light /dark box test where the animals treated with MG (25 mg / kg) remained longer in the light area 4 h after MG administration. This same effect was seen in treatment with repeated doses of MG. Biochemical analysis revealed that treatment with MG (10 and 25 mg / kg) is not capable of altering levels of glutathione, and expression of glutamate-cysteine ligase enzyme glutathione reductase, glyoxalase 1 and thioredoxin reductase in the hippocampus, striatum and cerebral cortex, except for increased TrxR activity in the hippocampus. The type-depressant behavior induced by MG has not been found in other studies with intracerebroventricular injection and for prolonged periods, though the behavioral tests acutely (15 min, 4 h) and repeated administration here were quite consistent. The known anxiolytic effect was confirmed by our experimental data, whose mechanism of action appears to involve the GABAA receptor. The data set, along with those presented by other authors, confirm that the MG is involved in the modulation of behaviors related to depression and anxiety in rodents. In addition, this study showed the MG is not able to change the biochemical parameters related to the antioxidant defenses 4 h after administration. The search for MG mechanisms of action still need to be investigated in future studies.

Keywords: Methylglyoxal; Depression; Anxiety; Glutathione; Glyoxalase; Thioredoxin.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Sintomas dos transtornos depressivos, segundo o DSM-V	21
Figura 1: Fórmula estrutural do metilglioxal.	28
Figura 2: Formação do metilglioxal.	29
Figura 3. Detoxificação do metilglioxal.	31
Figura 4: Protocolos experimentais.	44
Figura 5. Efeito da administração de metilglioxal no tempo de imobilidade no TSC.	51
Figura 6. Efeito da administração de metilglioxal sobre a ansiedade e atividade locomotora no TCA.	52
Figura 7. Efeito da administração de metilglioxal no mapa de exploração tigmotáxico no TCA.	53
Figura 8. Efeito da administração de metilglioxal sobre os parâmetros comportamentais no teste da caixa claro/escuro (TC/E).	55
Figura 9. Efeito da administração de metilglioxal sobre os níveis de GSH-t no córtex cerebral, hipocampo e estriado.	56
Figura 10. Efeito da administração de metilglioxal sobre a atividade enzimática Glo1, GR e TrxR nas estruturas cerebrais: córtex cerebral, hipocampo e estriado.	57
Figura 11. Expressão relativa das enzimas Glo1, GCL e TrxR no córtex cerebral, hipocampo e estriado 4 h após administração de metilglioxal 10 ou 25 mg/kg.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DSM-V	Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais - 5ª edição
CID-11	Classificação Internacional de Doenças
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
5-HT	Serotonina/5-hidroxitriptamina
NMDA	N-metil-D-aspartato
IL-6	Interleucina 6
IL-1 β	Interleucina 1 β
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A	Receptores de GABA do tipo A
BDZ	Benzodiazepínicos
GABA _B	Receptores de GABA do tipo B
MG	Metilglioxal
TPI	Triose-fosfato isomerase
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
AGEs	Produtos de glicação avançada
Glo1	Glioxalase-1
Glo2	Glioxalase-2

GSH	Glutationa reduzida
HAB	Comportamento tipo-ansioso aumentado
LAB	Comportamento tipo-ansioso diminuído
Trx	Tiorrexodina
TrxR	Tiorredoxina redutase
GCL	Glutamato cisteína ligase
GS	Glutationa sintetase
GSSG	Glutationa dissulfeto
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
GR	Glutationa redutase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
WHO	Organização mundial de saúde
i.p.	Injeção intraperitoneal
GSH-t	Glutationa total
TSC	Teste da suspensão pela cauda
TCA	Teste do campo aberto
TC/E	Teste da caixa claro-escuro
PCA	Ácido perclórico
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
i.c.v.	Injeção intracerebroventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Depressão	20
1.1.1	Hipótese monoaminérgica.....	22
1.1.2	Hipótese gabaérgica	23
1.1.3	Hipótese do estresse oxidativo	24
1.2	Ansiedade	25
1.3	Modelos animais preditivos de comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso	26
1.4	Metilglioxal	27
1.4.1	Sistema da glioxalase	30
1.4.2	Metilglioxal: relação com os transtornos de humor32	
1.5	Defesas antioxidantes	34
1.5.1	Metabolismo da glutatona	34
1.5.2	Sistema da tiorredoxina.....	35
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	OBJETIVO	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.1	Objetivos Específicos	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Animais	43

4.2	Tratamentos	43
4.3	Testes comportamentais	44
4.3.1	Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	45
4.3.2	Teste do campo aberto (TCA)	45
4.3.3	Teste da caixa claro-escuro (TC/E).....	46
4.4	Análises bioquímicas.....	46
4.4.1	Glutathione total.....	46
4.4.2	Atividade enzimática	46
4.4.3	Western blotting	48
4.5	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS	50
5.1	Efeitos da administração de metilglioxal sobre o comportamento tipo-depressivo.....	50
5.2	Efeitos da administração de metilglioxal sobre a atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso	51
5.3	Efeitos da administração de metilglioxal sobre as defesas antioxidantes	56
6	DISCUSSÃO.....	60
7	PERSPECTIVAS	67
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é caracterizada pelo humor deprimido, perda de interesse e prazer, distúrbios na energia, sono e apetite, e déficits cognitivos (DSM-V, 2013). A etiologia da depressão tem origem em uma complexa interação de fatores, incluindo os genéticos e ambientais. A expressão fenotípica dessa doença inclui episódios frequentes de alteração de humor, incluindo alterações cognitivas (falta de concentração, dificuldade na realização de atividades e formação do pensamento), motoras (fadiga), autonômicas (inquietação), e no ciclo sono/vigília (insônia) (SHALTIEL; CHEN; MANJI, 2007).

Para o possível diagnóstico da depressão, a medicina clínica conta atualmente com o auxílio de manuais específicos de Saúde Mental, tais como o "Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais - 5ª edição" (DSM-V) e a "Classificação Internacional de Doenças" (CID-11). Manuais que servem como auxílio para o diagnóstico correto da depressão após a verificação de alguns sintomas, segundo critérios clínicos que se encontram também nesses documentos. Esses critérios de avaliação se encontram descritos na tabela 1.

Tabela 1. Sintomas dos transtornos depressivos, segundo o DSM-V.

<ul style="list-style-type: none"> • Humor deprimido na maior parte do tempo e todos os dias, indicado pelo indivíduo (sentimento de tristeza ou vazio) ou por indivíduos de sua convivência • Diminuição marcante no interesse ou prazer em todas, ou quase todas, as atividades diárias (indicado pelo paciente ou por indivíduos de sua convivência)
<ul style="list-style-type: none"> • Perda ou ganho de peso de forma significativa ou falta de apetite • Insônia ou hipersônia todos os dias • Agitação ou retardo psicomotor • Fadiga ou falta de energia • Sentimento de inutilidade ou culpa • Diminuição na capacidade de concentração ou pensar ou de tomar decisões • Pensamento recorrente de morte ou idealização e tentativa de suicídio

*Para o diagnóstico da depressão em um paciente, ele deve apresentar no mínimo um dos sintomas descritos na parte superior da tabela e totalizar ao menos cinco sintomas por um período mínimo de duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Indivíduos que exibem os casos mais graves de depressão apresentam altas taxas de comorbidades. Entre as comorbidades encontram-se os transtornos de ansiedade, diabetes, ocorrência do pensamento suicida e redução da qualidade de vida (NEMEROFF, 2007). Existem muitos estudos na literatura confirmando a ocorrência de depressão e ansiedade no mesmo momento. Por exemplo, em um estudo de larga escala realizado na Holanda, dos 1.783 pacientes 75% destes apresentaram transtorno de ansiedade durante todo o período em que os episódios depressivos foram verificados. Dentre os pacientes diagnosticados com o transtorno de ansiedade, 81% apresentam sintomas da depressão durante todo o período em que o transtorno de ansiedade esteve presente (LAMERS et al., 2011).

Estudos epidemiológicos também sugerem que existe uma relação entre diabetes e a depressão. Entre os pacientes que apresentam

diabetes mellitus com hiperglicemia, 20% destes apresentam comorbidade com a depressão (GAVARD; LUSTMAN; CLOUSE, 1993). Ainda, o diabetes, por si só, aumenta o risco de depressão em 28% em indivíduos femininos e em 18% em indivíduos masculinos (ANDERSON et al., 2001). Em uma meta análise, os autores mostram que uma incidência maior de diabetes foi encontrada em indivíduos depressivos quando comparado com indivíduos não depressivos (0,72% VS 0,47%, respectivamente) (ROTELLA; MANNUCCI, 2013), assim como a presença da depressão apresenta um risco maior para o desenvolvimento das complicações da síndrome metabólica da diabetes.

1.1.1 Hipótese monoaminérgica

Uma das hipóteses aceitas para descrever os mecanismos causais da depressão é a hipótese monoaminérgica. Esta é fundamentada em estudos que demonstram a existência de uma deficiência funcional ou quantitativa dos neurotransmissores noradrenalina, dopamina e serotonina (COPPEN; DOOGAN, 1988; MANN et al., 1996; WONG; LICINIO, 2001), assim como, de seus respectivos receptores, que podem demonstrar uma ineficiência (COPPEN; DOOGAN, 1988; SCHILDKRAUT, 1965). Os neurotransmissores monoaminérgicos noradrenalina, adrenalina e dopamina são sintetizados a partir do aminoácido tirosina no terminal pré-sináptico, numa reação catalisada pela enzima tirosina hidroxilase, convertendo L-tirosina a 3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Este último é convertido a dopamina pela DOPA descarboxilase. A dopamina, por sua vez, é convertida a noradrenalina pela dopamina- β -hidroxilase (KUCHAR; COUCEYRO; LAMBERT, 1999). A serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), é sintetizada a partir do triptofano que é convertido no terminal pré-sináptico a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase. Este, por sua vez, é convertido a serotonina pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (FULLER, 1980).

Esta hipótese monoaminérgica se sustenta, em parte, na observação de que os sintomas melhoram em pacientes que fazem uso de antidepressivos tricíclicos, inibidores da enzima monoamina oxidase, inibidores de recaptação de serotonina/noradrenalina/dopamina, e fármacos que atuam aumentando a disponibilidade destas monoaminas na fenda sináptica (ORDWAY et al., 1999; ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004). Entretanto, esta teoria apresenta algumas limitações. Por exemplo, o fato de que alguns agentes com propriedade

antidepressiva não agirem sobre o sistema monoaminérgico e que nem toda droga que aumenta as monoaminas na fenda sináptica apresenta efeito antidepressivo (exemplo, a cocaína e anfetaminas) (ELHWUEGI, 2004; HASLER, 2010). Além disso, o efeito clínico na remissão dos sintomas depressivos só ocorre de 3 a 4 semana após o início do tratamento. Este efeito antidepressivo foi vinculado ao aumento nos níveis de monoaminas (ROSENBLAT et al., 2015).

1.1.2 Hipótese gabaérgica

Outra hipótese que descreve os mecanismos causais da depressão sugere que há uma desregulação do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Existem evidências desde 1980, mostrando que diminuição na neurotransmissão gabaérgica está relacionada ao desenvolvimento da depressão (GOLD et al., 1980; PEHRSON; SANCHEZ, 2015). Esta teoria prevê que, se o desenvolvimento da depressão está relacionado a uma diminuição da atividade gabaérgica, então o uso de fármacos que potencializam esta transmissão, deve melhorar o prognóstico dos pacientes depressivos.

O uso de benzodiazepínicos (BDZ), como exemplo o alprazolam, um agonista de receptores GABA do tipo A ($GABA_A$), é capaz de reduzir os sintomas da depressão quando comparado ao grupo de indivíduos placebo. Além disto, o tratamento de pacientes depressivos com o alprazolam foi tão efetivo quanto antidepressivos tricíclicos (BIRKENHÄGER; MOLEMAN; NOLEN, 1995). Alguns estudos com antidepressivos ou terapia eletroconvulsivante levam ao aumento das concentrações de GABA no córtex occipital, quando comparado com as concentrações basais dos próprios pacientes depressivos (SANACORA et al., 2002, 2003). Outros autores afirmam que alguns antidepressivos podem atuar aumentando a concentração de GABA, como a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina. A administração aguda ou repetitiva deste fármaco em roedores foi capaz de elevar as concentrações de GABA no líquido cefalorraquidiano (GÖREN et al., 2007). Além disto, há um aumento da expressão de genes relacionados a subunidades $GABA_{A\beta 3}$, $GABA_{A\delta}$ e $GABA_{A\gamma 2}$ do receptor $GABA_A$ no cíngulo anterior do córtex, assim como, na porção dorsolateral do córtex pré-frontal de pacientes depressivos (CHOUDARY et al., 2005). A análise de diversas regiões cerebrais de pacientes depressivos demonstrou que 19 genes relacionados a subunidades do receptor $GABA_A$ estavam aumentados na região do córtex temporal e pré-frontal (SEQUEIRA et al., 2009).

Porém, a escassez de informações em torno da ligação de neurotransmissor GABA ao seu receptor e atividade funcional, dificultam conclusões sobre se estas alterações contribuem para o desenvolvimento da depressão (PEHRSON; SANCHEZ, 2015).

A função do receptor GABA do tipo B (GABA_B) na depressão tem sido pouco estudada. Uma diminuição na expressão das subunidades GABBR1 e GABBR2 foi encontrada na porção lateral do cerebelo de pacientes depressivos (FATEMI; FOLSOM; THURAS, 2011). Contudo, estudos pré-clínicos mostraram que o bloqueio farmacológico ou *knockout* de receptores GABA_B induzem um efeito tipo-antidepressivo em uma variedade de modelos de depressão, como o estresse crônico brando, desamparo aprendido e teste do nado forçado. Por outro lado, a ativação de receptores GABA_B bloqueiam o efeito de antidepressivos ou induzem um efeito tipo-depressivo (CRYAN; SLATTERY, 2010). Ainda, um experimento clínico demonstrou que a ativação de receptores GABA_B, através do uso de baclofen, induziu um aumento dos sintomas depressivos em uma pequena amostra de pacientes depressivos. Sintomas que desapareceram após a interrupção do tratamento com baclofen (POST et al., 1991).

1.1.3 Hipótese do estresse oxidativo

A expressão, atividade e concentração de enzimas relacionadas as defesas antioxidantes no sangue, líquido e em diferentes regiões cerebrais estão alteradas em pacientes depressivos. Além disto, a peroxidação de ácidos graxos e de proteínas de membrana aumentam as respostas autoimunes (MAES et al., 2008, 2010).

Em uma meta-análise com paciente depressivos, os níveis de peróxidos se encontram elevados no momento dos episódios depressivos (LIU et al., 2015), ainda, foi observado aumento da atividade SOD e catalase (GAŁECKI et al., 2009; SARANDOL et al., 2007) e diminuição da atividade GPx (OZCAN et al., 2004). Mulheres diagnosticadas com depressão apresentam concentrações diminuídas de GSH, diminuição na atividade de GPx e aumento na atividade de GR (KODYDKOVÁ et al., 2009). Um estudo realizado com pacientes depressivos que não recebiam medicamento por pelo menos 2 meses, relata diminuição no potencial antioxidante total, assim como, aumento das concentrações plasmáticas de peróxidos e índices maiores de estresses oxidativo, quando comparados aos indivíduos saudáveis (YANIK; EREL; KATI, 2004).

Estudos pré-clínicos mostram que a GSH, um importante agente antioxidante, induz um efeito tipo-antidepressivo em camundongos (ROSA; DAFRE; RODRIGUES, 2013). Ainda, em modelos de depressão, como a derrota repetida (PATKI et al., 2013) e estresse crônico imprevisível (YANG et al., 2013), foi observado uma diminuição na expressão das enzimas GR, SOD no hipocampo e de enzimas relacionadas ao metabolismo de GSH no córtex pré-frontal de camundongos.

Em conclusão, diversos estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram distúrbios nos sistemas antioxidantes, assim como, aumento de marcadores de estresse oxidativo. Portanto, alterações oxidativas podem fazer parte dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da depressão (MICHEL; PÜLSCHEN; THOME, 2012).

1.2 Ansiedade

Diversas alterações comportamentais são conhecidas por apresentarem um papel evolutivo, dentre estas, o medo e a ansiedade. O medo ocorre em momentos onde o indivíduo percebe uma ameaça iminente, enquanto que a ansiedade é a antecipação de uma ameaça futura, ambos relacionados com a função de preservação da vida. De tal forma, estes comportamentos poderiam preparar o indivíduo para lidar com a situação estressante e, por fim, manter seu bem-estar e segurança (CRYAN; KAUPMANN, 2005; CRYAN; SLATTERY, 2007; LANG; DAVIS; OHMAN, 2000).

Como mencionado anteriormente, a medicina clínica se apoia na DSM-V e na CID-11, para a realização de um diagnóstico correto do transtorno de ansiedade. Devido a variedade de sintomas, estes critérios servem para a caracterização específica do transtorno de ansiedade. Segundo o DSM-V, a prevalência para o transtorno generalizado de ansiedade é de 0,9% entre adolescentes e de 2,9% entre adultos na comunidade geral dos Estados Unidos, e de 0,4 a 3,6%. para outros países. Ainda, indivíduos do sexo feminino tem duas vezes mais probabilidade de experimentar transtornos de ansiedade generalizada. Em uma análise sistemática realizada no Brasil, no período de 1997 a 2009, a prevalência variou de 8,7% na vida, 4,9% no ano e 4,3% no mês. Estes dados foram obtidos da população adulta, acometendo mais mulheres e trabalhadores (SANTOS; SIQUEIRA, 2010). Indivíduos ansiosos tendem a exacerbar a sensação de periculosidade em determinadas situações, desencadeando alterações comportamentais e

fisiológicas, as quais são similares aos padrões comportamentais observados em modelos animais de ansiedade. Como mencionado anteriormente, embora tais transtornos emocionais estejam ligados com a manutenção do bem-estar do indivíduo, o excesso de ansiedade e a dificuldade em recuperar o estado normal do indivíduo, podem produzir perturbações fisiológicas. Para que estas alterações voltem ao normal, há necessidade de ação terapêutica através de fármacos, especialmente nos casos de ansiedade generalizada e transtorno do pânico (HOFFMAN; DUKES; WITTCHEN, 2008).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da ansiedade também são utilizados para o tratamento da depressão. Consistem de inibidores de recaptção de serotonina, os quais são eficaz no transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, e transtorno pós-traumático (BALDWIN; WALDMAN; ALLGULANDER, 2011; FINEBERG et al., 2013). No entanto, o uso de tais fármacos leva ao aparecimento de diversos efeitos colaterais incluindo insônia, náusea e disfunções sexuais e no início do tratamento um aumento do nervosismo/ansiedade (DELL'OSSO et al., 2010).

Outros fármacos utilizados no tratamento para a ansiedade são os BDZ. Os BDZ tem sua ação ansiolítica mediada por receptores de GABA_A, potencializando os efeitos inibitórios da neurotransmissão gabaérgica (KIRKPATRICK et al., 2016). O papel do neurotransmissor inibitório GABA é central na regulação da ansiedade. Sendo que, os sintomas característicos da ansiedade desaparecem quando o indivíduo é tratado com agonistas de receptores GABA. Estes dados apontam uma disfunção em vias de neurotransmissão similares para ambas as desordens, depressão e ansiedade (MÖHLER, 2012). Ainda, estudos pré-clínicos demonstraram que quando GABA ou BDZ, como o alprazolam, são infundidos na amígdala de camundongos, induzem um efeito ansiolítico. Por outro lado, a infusão de antagonistas de receptores GABA geram um efeito ansiogênico (LYDIARD, 2003).

1.3 Modelos animais preditivos de comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso

Dois testes preditivos de ação antidepressiva, em particular, são úteis devido a facilidade de uso, reprodutibilidade dos resultados e sensibilidade ao tratamento com antidepressivos: teste de suspensão pela cauda (STERU et al., 1985) e teste do nado forçado (PORSOLT;

BERTIN; JALFRE, 1977). Estes testes são baseados na observação de que quando ratos ou camundongos são submetidos a uma situação inescapável (como exemplo, suspensos pela causa ou imersos em um cilindro contendo água), após um curto período tentando o escape, o animal rapidamente se adapta e adquire uma postura de imobilidade. Ou seja, as tentativas de fuga diminuem ou cessam e o animal faz somente os movimentos para ficar na superfície da água. Este comportamento de flutuação é considerado como imobilidade, e acredita-se expressar um comportamento de desespero e perda da persistência do comportamento de escape. A imobilidade também pode ser interpretada como um comportamento passivo em que o animal cessa formas ativas de lidar com situações de estresse. Se um antidepressivo é utilizado, o animal persistirá com o comportamento de escape por mais tempo, diminuindo o comportamento de imobilidade do animal. Os compostos que aumentam o tempo de imobilidade do animal são interpretados como compostos que induzem um comportamento tipo-depressivo (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; CRYAN; SLATTERY, 2007; PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005).

Existem inúmeros testes comportamentais que caracterizam o comportamento tipo-ansioso. Dentre esses testes, o teste da caixa claro/escuro, que é baseado na aversão inata de roedores a ambientes iluminados. Quanto maior o tempo na caixa clara, menor é considerado o comportamento tipo-ansioso. De tal forma, fármacos com conhecido efeito ansiolítico aumentam a atividade no compartimento claro. Outro teste bastante utilizado é o teste do campo-aberto, o qual é baseado no comportamento espontâneo de roedores em resposta a exploração de ambientes novos, sendo que quanto menor o tempo no centro, maior é considerado o comportamento tipo-ansioso (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; MIRRLEES; THORNALLEY, 1993).

1.4 Metilglioxal

O MG é um α -cetoaldeído de três carbonos (Fig. 1), designado quimicamente como 2-oxopropanol, formado por diferentes vias metabólicas, sendo a glicólise a principal delas (Fig. 2). Na glicólise, a formação do MG ocorre através da formação das trioses-fosfato, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (KALAPOUS, 1999). A formação de MG também pode ocorrer por meio do metabolismo de lipídios. Neste caso, o glicerol, o acetoacetato ou a acetona são convertidos em 1,2-dicarbonil, e este em MG (SHIBAMOTO, 2006).

Além disso, o MG pode ser formado ainda pelo catabolismo da treonina, a qual é transformada em aminoacetona, levando a formação de MG (LYLES; CHALMERS, 1992; REICHARD et al., 1986).

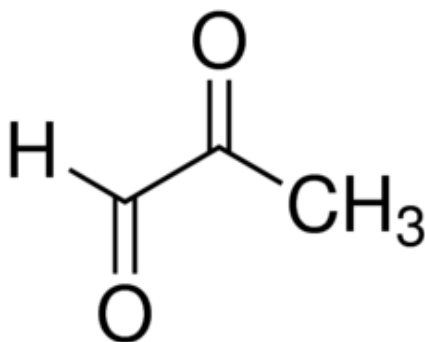


Figura 1: Fórmula estrutural do metilglioxal. Nomenclatura IUPAC: 2-oxopropanol. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m0252>, acessado em agosto de 2016.

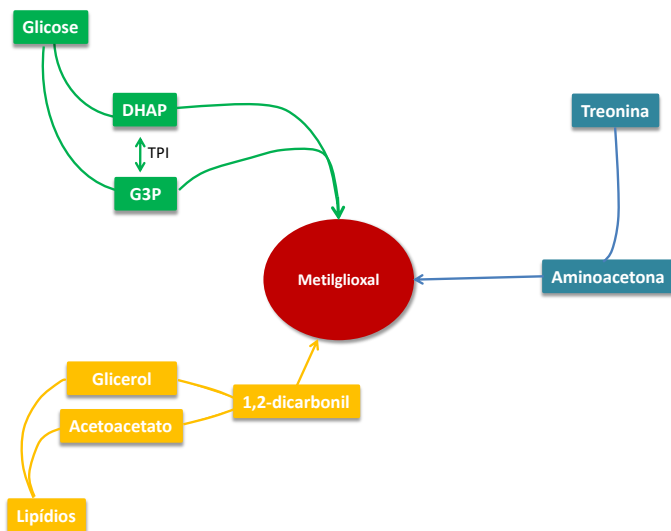


Figura 2: Formação do metilglioxal. Na glicólise a formação do MG ocorre através da formação das trioses-fosfato, di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (G3P), ou pela catálise envolvendo a enzima triose-fosfato isomerase (TPI). A formação de MG também pode ocorrer por meio do metabolismo de lipídios. Neste caso, o glicerol ou o acetoacetato são convertidos em 1,2-dicarbonil, e este em MG. Além disso, o MG pode ser formado ainda pelo catabolismo da treonina, a qual é transformada em aminoacetona e pode levar a formação de MG. Fonte: o autor.

Os açúcares redutores, dentre eles a glicose e o MG, são importantes agentes glicantes de proteínas e de outros componentes celulares, devido a realização da reação de Maillard, onde há a formação de compostos que são altamente eletrófilos e apresentam alta reatividade. Ainda, os agentes glicantes mais reativos são aqueles que possuem duas carbonilas, como o MG. O MG reage formando adutos, principalmente com os grupamentos amino da cadeia lateral de resíduos básicos de aminoácidos, arginina, lisina formando os produtos de glicação avançada (AGEs - do inglês, *advanced glycation end products*). Além destes, a cisteína, por ser um forte nucleófilo, também tem alta reatividade com o MG, sendo considerado o alvo primário do MG, entretanto, devido a sua reversibilidade, a formação de AGEs acaba sendo um marcador mais preciso da formação de MG (THORNALLEY,

2002). Autores sugerem a participação dos AGEs como agentes causais na fisiopatologia de diversas doenças, como as alterações microvasculares que ocorrem no diabetes e macrovasculares que ocorrem na aterosclerose (BROWNEE, 2001; HAMBSCH et al., 2010; JACK; WRIGHT, 2012).

O MG é encontrado no plasma de camundongos em concentrações de 0,1 a 0,5 μM (KALAPOUS, 2013) e no líquido cefalorraquidiano estas são em torno de 5 μM (DISTLER et al., 2012). Em humanos, as concentrações plasmáticas se encontram entre 0,08 a 0,17 μM (BEISSWENGER et al., 1999), enquanto que no líquido cefalorraquidiano de indivíduos saudáveis as concentrações se mantêm entre 10 a 20 μM (KUHLE et al., 2005). O acúmulo de MG ocorre sob a condição de hiperglicemia, metabolismo debilitado de glicose e deficiência da enzima triosefosfato isomerase (OROSZ; OLÁH; OVÁDI, 2009; YAN; YAN, 2014).

Pacientes afetados pela Doença de Alzheimer apresentam níveis elevados de MG (20 a 40 μM) no fluido cerebrospinal, sendo até 2 vezes maiores se comparado a indivíduos normais. Nestes pacientes há um aumento nos níveis de AGEs, especialmente em estágios mais tardios da doença (KUHLE et al., 2005). Altos níveis de MG no soro estariam associados com uma maior perda de atividade cognitiva de pessoas idosas, indicando que uma perturbação no metabolismo do MG pode levar a um aumento de suas concentrações plasmáticas (BEERI et al., 2011).

1.4.1 Sistema da glioxalase

A detoxificação do MG foi estabelecida a partir do isolamento, purificação e caracterização das enzimas responsáveis pela sua degradação, o que foi demonstrado para diferentes organismos (THORNALLEY, 1996). Em 1913, foi observado que o metilglioxal pode ser convertido a D-lactato por um sistema enzimático, o sistema da glioxalase (Fig. 3). Este sistema está presente no citoplasma das células eucarióticas e é formado pelas enzimas: glioxalase 1 (Glo1), glioxalase 2 (Glo2) e pelo tripeptídeo GSH (RABBANI; THORNALLEY, 2012). O MG reage de forma espontânea com o grupamento tiol da GSH, formando hemitioacetil, o qual é metabolizado pela Glo1, formando S-D-lactoilglutathione. Por sua vez, este é hidrolisado pela Glo2, formando D-lactato (Fig. 3). A GSH, que é consumida na reação catalisada pela

1.4.2 Metilglioxal: relação com os transtornos de humor

Diversos estudos com linhagens de camundongos têm identificado a associação entre a enzima Glo1 e fenótipos comportamentais. As evidências de alterações na expressão de Glo1 ou que níveis de MG estariam associados à modulação do comportamento ansioso e tipo-depressivo são debatidos na literatura (HOVATTA et al., 2005; KRÖMER et al., 2005a). A modulação do comportamento ansioso foi induzida através do uso de vetores virais para a superexpressão ou subexpressão da enzima Glo1. Em um estudo utilizando linhagens com diferentes graus de ansiedade foram identificados 17 genes relacionados positivamente ao comportamento tipo-ansioso. Dentre estes genes, a Glo1 e a glutatona redutase (GR), mostraram-se particularmente relacionadas com o comportamento tipo-ansioso. Estes autores confirmaram estes estudos, mostrando que a superexpressão da Glo1 provocou um aumento no comportamento tipo-ansioso, enquanto que o subexpressão desta enzima provocou uma diminuição no comportamento tipo-ansioso em camundongos, demonstrando uma participação da Glo1 na modulação do comportamento tipo-ansioso (HOVATTA et al., 2005).

Em um estudo que visou avaliar diversos marcadores genéticos em linhagens de camundongos, dentre eles a Glo1, os autores destacam a existência de associação entre níveis aumentados de Glo1 e aumento do comportamento tipo-ansioso (BENTON et al., 2012), indicando que maiores níveis de MG produzem efeito ansiolítico. Outro estudo correlacionou a expressão da Glo1 e o comportamento tipo-ansioso em camundongos. Este estudo utilizou duas linhagens, uma com comportamento tipo-ansioso aumentado (HAB, do inglês: *high anxiety like behavior*) e outra com comportamento tipo-ansioso diminuído (LAB, do inglês: *low anxiety like behavior*). A linhagem LAB apresentou níveis maiores de Glo1 quando comparado a linhagem HAB, sugerindo que maiores níveis de Glo1 seria um biomarcador para baixos níveis de ansiedade (KRÖMER et al., 2005a), o que é contrário aos achados de Hovatta e colaboradores (HOVATTA et al., 2005). Posteriormente foi demonstrado que variantes no número de cópias da Glo1 poderia explicar estas aparentes discrepâncias, e que os animais LAB tinham níveis elevados de MG, apesar de terem elevada expressão de Glo1 (DISTLER et al., 2012). Assim, fica claro que o MG está positivamente associado a um efeito ansiolítico.

Alguns autores enfocam a possibilidade de que uma maior atividade de Glo1 esteja associada ao comportamento tipo-ansioso por diminuir a concentração de MG, a administração intraperitoneal de MG levou a uma diminuição no comportamento tipo-ansioso (DISTLER et al., 2012). Em um estudo no qual foi administrado MG de forma intracérebroventricular por 6 dias, os animais tratados com MG demonstraram uma diminuição no comportamento tipo-ansioso (HAMBSCH et al., 2010). Outros autores utilizaram animais transgênicos com um aumento na expressão de Glo1, levando ao aparecimento de comportamento tipo-ansioso.

Dados recentes mostraram que a administração de MG foi capaz de diminuir o comportamento tipo-ansioso em um estudo com uma linhagem transgênica de animais (FLOXGlo1KlxSyn-CRE) que superexpressão Glo1. Os autores utilizaram protocolos de microinjeção de MG na amígdala basolateral, região do cérebro envolvida com o transtorno de ansiedade, levando assim, a uma diminuição do comportamento tipo-ansioso ou efeito ansiolítico (MCMURRAY et al., 2016).

O efeito ansiolítico de MG parece depender de sua ação como agonista de receptor GABA_A, conforme caracterizado por Distler e colaboradores (DISTLER et al., 2012). O tratamento de animais com MG, em doses baixas, induz um efeito ansiolítico, enquanto que em doses altas de MG induz um déficit locomotor, ataxia e hipotermia, efeitos característicos de ativadores dos receptores de GABA_A. A partir de eletrofisiologia em neurônios primários os autores mostram a seletividade competitiva do MG por receptores GABA_A, através da coaplicação de SR-95531 (antagonista de receptor GABA_A) e de GABA (DISTLER et al., 2012).

Não só a ansiedade está relacionada a expressão da enzima Glo1 ou níveis de MG, mas também o comportamento tipo-depressivo. Outro estudo avaliou diversos marcadores genéticos em linhagens de camundongos com diferentes perfis de ansiedade, incluindo as linhagens: BALB/cByJ, BUB/BnJ, C57BL/6J, C57BR/cdJ, CBA/J, MA/MyJ, P/J, PL/J, and SM/J, sendo que as enzimas GR e e Glo1 foram as que melhor se correlacionaram. Os autores destacam uma correlação positiva entre níveis aumentados de Glo1 e o comportamentos tipo-depressivo através do TSC, ou seja, os animais que com maior tempo de imobilidade apresentam níveis maiores de Glo1 (BENTON et al., 2012). Ainda, alguns autores demonstram um efeito tipo-antidepressivo de injeção i.c.v. de MG (BENTON et al., 2012; HAMBSCH et al., 2010).

Em humanos, há correlação negativa entre a expressão da enzima Glo1 e a depressão, ou seja, quanto menores os níveis Glo1 maior será a incidência de depressão. Os níveis de mRNA de Glo1 estavam reduzidos nos leucócitos de pacientes diagnosticados com o transtorno depressivo e transtorno bipolar, retornando a níveis basais após a remissão dos sintomas (FUJIMOTO et al., 2008). No entanto, este estudo não estabeleceu se os níveis de proteína ou a atividade enzimática de Glo1, nem se os níveis de MG estariam afetados. Ainda, em modelos de depressão com camundongos, como a derrota repetida (PATKI et al., 2013) e estresse crônico imprevisível (YANG et al., 2013), a expressão de Glo1 estava diminuída no hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente. Estes dados demonstram que a depressão está associada a menor atividade Glo1, e possivelmente a maiores níveis de MG, contrariamente aos estudos com animais citados anteriormente.

1.5 Defesas antioxidantes

Substâncias que atrasam, previnem ou removem o dano oxidativo de uma molécula-alvo são definidas como antioxidantes (HALLIWELL, 2006). Os antioxidantes têm a função de interromper as cascatas de oxidação providas da quebra da homeostasia redox (COLLINS et al., 2015). A glutathiona (GSH) é um antioxidante, sendo o tiol de baixo peso molecular mais abundante. Outros antioxidantes de baixo peso molecular são o ácido ascórbico (Vitamina C) e o α -tocoferol (Vitamina E). Dentre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (Prx) são consideradas as mais importantes na eliminação de superóxido (SOD) e peróxidos (catalase, GPx e Prx) (HALLIWELL, 2006).

1.5.1 Metabolismo da glutathiona

A glutathiona (GSH) (γ -glutamil-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo formado a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, em uma reação ATP-dependente. A glutamato cisteína ligase (GCL) é a primeira enzima participante da formação de GSH através da formação do dipeptídeo γ -glutamil-cisteína. Realiza a ligação peptídica entre o grupo amina da cisteína e o grupo carboxil da cadeia lateral do glutamato (carbono γ). Acredita-se que esta ligação impede a ação da maioria das peptidases, permitindo que os níveis de GSH intracelulares sejam elevados (1-10 mM). A glutathiona sintetase (GS) é a segunda

enzima participante da formação de GSH, através da união peptídica entre o resíduo de cisteína e glicina, formando a GSH

A GSH é o tiol de baixo peso molecular mais abundante em tecidos animais e vegetais, com concentrações variando entre 2 e 10 mM (WU et al., 2004), sendo que sua cisteína possui o grupo tiol responsável pela sua capacidade antioxidante. Sendo conhecida, como um agente redutor muito potente e agregado as altas concentrações intracelulares, essa molécula é preferencialmente oxidada pelos agentes oxidantes, preservando outras estruturas celulares importantes. Um exemplo do seu papel protetor seria, a conjugação espontânea com o MG. Além disto, a presença constante de processos oxidativos requerem o uso da GSH como doadora de elétrons para reações enzimáticas e não enzimáticas. A oxidação da GSH leva a formação de forma de dissulfeto (GSSG). Esta é regenerada à GSH pela catálise da glutathione redutase (GR), que obtém os equivalentes redutores do NADPH. A GR é um homodímero formada por subunidades idênticas de 52,4 kDa, cada uma com um FAD no seu sítio ativo. A GR catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o FAD, que em seguida reduz uma ponte dissulfeto intramolecular em seu sítio catalítico. Os grupamentos tiólicos formados reduzem a GSSG, regenerando, assim, os níveis de GSH (HALLIWELL, 2006).

1.5.2 Sistema da tiorredoxina

Outra molécula que apresenta um potencial redutor, participando de reações de oxirredução e servindo como um doador de elétrons, trocas tiól/dissulfeto e algumas outras funções, é tiorredoxina (Trx). A Trx, em sua forma reduzida, apresenta dois motivos característicos (Cys-Gly-Pro-Cys). Estas cisteínas próximas são responsáveis pela redução de pontes de dissulfeto em proteínas oxidadas (BERNDT; LILLIG; HOLMGREN, 2007). Ao reduzir pontes de dissulfeto, a Trx torna-se oxidada por pontes dissulfetos, que é reduzida pela enzima tiorredoxina redutase (TrxR). Esta é uma flavoproteína homodimérica que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para a Trx (ARNÉR, 2009).

Em um trabalho recente (DAFRE et al., 2015) foi demonstrado que o MG, em doses tóxicas, é capaz de levar a diminuição dos níveis da Trx1 em células HT22. Por outro lado, doses subtóxicas podem induzir a síntese de TrxR1, provavelmente através da ativação do fator de transcrição Nrf2, entretanto, o MG pode provocar a inibição da

TrxR1. Em outro estudo, utilizando células endoteliais da aorta humana (OBA et al., 2012) os autores demonstram que a exposição ao MG 5 mM diminuiu a expressão e transcrição da Trx1, assim como, da peroxirredoxina, uma peroxidase dependente de Trx.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization -WHO*) estima que no mundo 350 milhões de pessoas são afetadas por transtornos depressivos. Quando presente no paciente por um longo período de tempo e em intensidade moderada ou severa, a depressão se torna um problema grave de saúde. A pessoa afetada perde rendimento no trabalho, na escola e em atividades cognitivas em geral. A patologia em seu pior estado pode levar ao suicídio, sendo este, caracterizado como a segunda maior causa de mortes entre 15 a 29 anos de idade (“WHO | Depression”, 2012), e estima-se que cerca de 800 mil pessoas morrem anualmente devido a esta doença.

O DSM-V, propõe uma abordagem descritiva dos indivíduos através dos seus sintomas. E caracteriza que em um período de 12 meses a prevalência da depressão nos Estados Unidos será de aproximadamente 7%, com diferenças entre as faixas etárias, sendo que em indivíduos na faixa etária de 18 a 29 anos a prevalência é três vezes maior do que em indivíduos acima dos 60 anos. Pessoas do sexo feminino experimentam índices 1,5 a 3 vezes mais altos do que as do sexo masculino. Tal classificação é utilizada no diagnósticos, em estudos epidemiológicos, estudos dos desfechos de tratamento, marketing das medicações psiquiátricas e prevenção destes transtornos na população em geral (PARKER; FLETCHER; HADZI-PAVLOVIC, 2012).

Estima-se que no Brasil, aproximadamente 54 milhões de pessoas desenvolverão depressão em algum momento de suas vidas. Destas, 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (NARDI, 2000). A ocorrência de episódios suicidas é uma característica preocupante, e que impulsiona ainda mais o estudo deste transtorno, tornando-se uma das principais doenças geradoras de custos socioeconômicos aos serviços de saúde e governos (BRANCHI et al., 2013; HUNTER et al., 2014; MATHERS; LONCAR, 2006).

Em um estudo conduzido em Florianópolis no ano de 2012, com 1.720 adultos de 20 a 59 anos, a prevalência de depressão foi de 16,2%, mais elevado em mulheres, idosos, viúvos ou separados, que consultaram médico nas últimas duas semanas e naqueles hospitalizados no último ano (BOING et al., 2012). Em uma correlação realizada para definir a prevalência do transtorno depressivo dentre várias outras doenças crônicas, os autores caracterizam a prevalência de depressão de 1,44 vezes maior para aqueles que apresentavam uma doença crônica. E

para aqueles que apresentavam duas ou mais doenças crônicas a prevalência de depressão é 2,25 vezes maior (BOING et al., 2012).

Muito se investe no desenvolvimento de novas medicações antidepressivas. As pesquisas relacionadas com estas medicações tem objetivos claros de encontrar medicamentos com menos efeitos colaterais que aqueles que estão em uso e produzir novos medicamentos para tratamento conjunto quando há associação entre distúrbios (depressão com ansiedade; anorexia nervosa, depressão com hiperatividade; depressão com diabetes) (WONG; LICINIO, 2001).

Cerca de 40 a 50% dos pacientes com o transtorno depressivo, que fizeram o uso de antidepressivos e/ou de terapias eletroconvulsivantes, demonstram uma recidiva nos episódios depressivos e/ou ainda, uma resposta inadequada aos tratamentos (BERMAN; NARASIMHAN; CHARNEY, 1997).

Uma vez que o MG é um composto endógeno, sintetizado em uma das vias metabólicas mais importantes, a via glicolítica (KALAPOUS, 1999), está relacionado com doenças neurodegenerativas (DISTLER et al., 2012), a depressão em estudos com humanos (FUJIMOTO et al., 2008; MEHTA; MENKE; BINDER, 2010) e com animais (DISTLER et al., 2012; HAMBSCH et al., 2010; MCMURRAY et al., 2016), utilizamos o tratamento experimental com MG como uma ferramenta para analisar o comportamento tipo-depressivo e ansioso em camundongos. Além disto, estudamos se há alterações bioquímicas associadas a este comportamento para entender os possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia da depressão. Sendo que existem dados com estudos de células em cultura mostrando que o MG pode afetar o sistema das glioxalases e o sistema Trx/TrxR, seria interessante saber se a o MG é capaz de alterar a atividade e/ou os níveis de expressão do sistema Trx/TrxR em um modelo *in vivo*.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da administração de MG em camundongos *Swiss Webster* na potencial modulação de comportamentos tipo-depressivo e relacionados a ansiedade, e nas alterações neuroquímicas relacionadas aos sistemas das glioxalases e da Trx/TrxR.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) de MG sobre os seguintes parâmetros comportamentais:
 - Tipo-depressivo através do teste de suspensão pela cauda;
 - Ansioso através do teste do campo aberto, e da caixa claro-escuro;
 - A atividade locomotora e exploratória de camundongos submetidos ao campo aberto;
 -
- ✓ Investigar as alterações nos níveis de GSH-t, assim como, na atividade das enzimas antioxidantes GR, TrxR e Glo1 e na expressão das enzimas GR, TrxR1 e Glo1 no córtex cerebral, hipocampo e estriado, 4 horas após a administração i.p. de MG;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas de 3 meses, com peso médio de 25 - 35 g. Os camundongos foram obtidos do Biotério Central da UFSC. Estes animais foram alojados em gaiolas plásticas de 32 cm de largura x 20 cm de altura x 21 cm de profundidade junto ao Biotério do Laboratório de Defesas Celulares, mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo 12 h claro/escuro, com início do ciclo claro às 7:00 h e alimentados *ad libitum* com ração comercial. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo No. PP00735). Os animais foram eutanasiados após os testes comportamentais ou eutanasiados e seu tecido encefálico dissecado para a obtenção de amostras.

4.2 Tratamentos

Para o tratamento pela via intraperitoneal (i.p.), os animais foram separados em grupos: controle (salina) e metilglioxal (MG: 3 a 200 mg/kg). Os testes comportamentais foram realizados em vários tempos após a injeção - 15 minutos e 4 horas com administração única, ou em doses repetidas, em que foram realizadas injeções diárias, por 6 dias consecutivos, com as doses indicadas e 24 horas após a última administração, os testes comportamentais foram realizados (Figura 4).

Após os testes comportamentais, no tratamento de 4 horas, os animais foram eutanasiados e amostras de córtex cerebral, de hipocampo e de estriado foram rapidamente dissecadas sobre placa de Petri invertida e mantida em gelo. Em seguida, uma porção das amostras foi imediatamente utilizada para preparação do extrato ácido para mensuração de glutathione total (GSH-t) e outra porção foi congelada em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até as análises bioquímicas serem realizadas.

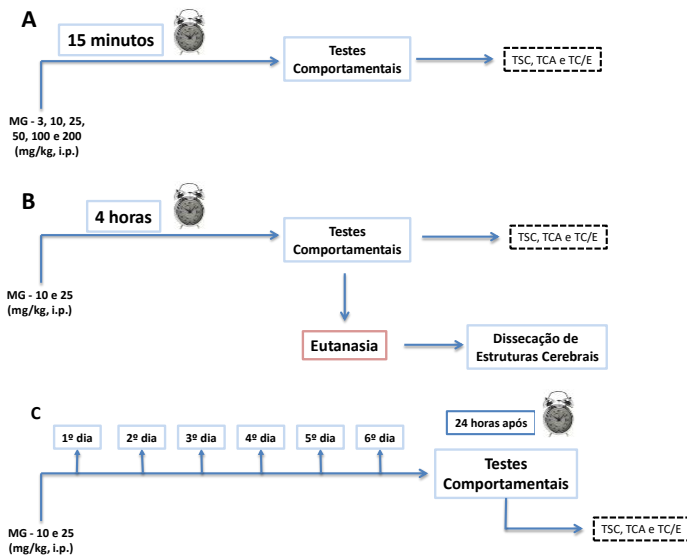


Figura 4: Protocolos experimentais. Metilglioxal (MG) foi administrado (3 - 200 mg/kg, i.p.) no protocolo de 15 minutos (A). Nos protocolos subsequentes, 4 horas (B) e 6 dias (C), MG foi administrado somente em duas doses (10 e 25 mg/kg, i.p.). Imediatamente, após cada um dos tratamentos (A-C), os testes comportamentais foram realizados (TSC, TCA e TC/E). Logo após a realização dos testes comportamentais do tratamento de 4 horas (B), os animais foram mortos e as estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) dissecadas.

4.3 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados durante o ciclo claro dos animais, entre 10 h da manhã e 17 h da tarde. Os animais foram ambientados por no mínimo 1h antes do início dos testes comportamentais. A limpeza dos aparatos foi feita com álcool 10%, sendo que estes foram limpos antes de cada teste comportamental. Todos os testes foram filmados para posterior análise dos dados.

4.3.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Este modelo foi proposto por (STERU et al., 1985) como alternativa ao Teste do Nado Forçado, também, como um modelo preditivo de atividade antidepressiva. O animal tende a se debater mantendo longas sequências de movimentos corporais, procurando apoio ou forçando seu próprio escape. Entretanto, sendo um estresse inescapável, no caso, causado pela suspensão da sua cauda, os animais tendem a desenvolver uma postura imóvel. O experimento consiste em fixar a extremidade distal da cauda do animal a uma barra horizontal de madeira a 60 cm de altura do chão. O animal fica preso à barra de madeira por 6 min com uma fita adesiva fazendo ângulo de 90° ao eixo longitudinal da cauda. O tempo de imobilidade é utilizado como uma medida de comportamento tipo-depressivo, sendo a imobilidade definida pela ausência de movimentos de fuga, incluindo balanços passivos do corpo e dessa forma, a diminuição do tempo de imobilidade representa um efeito tipo-antidepressivo, assim como, um aumento desse parâmetro indica um efeito tipo-depressivo (MANTOVANI et al., 2003).

4.3.2 Teste do campo aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de um eventual comportamento tipo-depressivo pela redução da atividade locomotora, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto. O teste foi desenvolvido por Calvin Hall (HALL, 1936). O aparato consistirá em uma arena de material acrílico de chão cinza (50 cm de altura x 50 cm de largura x 50 cm profundidade) cercado por paredes transparentes (50 cm de altura). No teste, cada animal é colocado no centro da arena, permitindo explorar livremente o ambiente durante 6 minutos. Como parâmetros de atividade locomotora serão utilizados a distância total percorrida (m), a velocidade média (m/s), onde uma diminuição desses parâmetros demonstra uma diminuição da atividade locomotora. Ainda, como parâmetros de ansiedade foram utilizados o número de entradas na área central (n°) e o tempo permanecido na área central (s). Onde um aumento do tempo permanecido na área central e do número de entradas na mesma área representam um efeito ansiolítico do composto analisado. O chão do aparato utilizado no TCA foi limpo com álcool 10% entre a troca de animais.

4.3.3 Teste da caixa claro-escuro (TC/E)

O modelo inicial do teste da caixa claro-escuro se baseia nos estudos de (CRAWLEY; GOODWIN, 1980), mas ao longo do tempo diversos autores criaram modificações ao modelo. Neste trabalho 2/3 do compartimento do aparato consistia na cor claro (branco) e o restante 1/3 do compartimento na cor escuro (preto), com um tamanho interior de 46 x 27 x 30 (cm), e com um túnel de 7 cm, entre os dois compartimentos, modelo descrito por (BOURIN et al., 1996). Os animais iniciaram o teste no compartimento claro com uma duração de 5 minutos de teste, tendo como parâmetros analisados as transições entre os compartimentos (n°), tempo permanecido no compartimento claro (s) e latência de entrada no compartimento escuro (s). Sendo descrito que um aumento dos tempos de permanência no compartimento claro e latência para entrada no compartimento escuro representam um efeito ansiolítico do composto analisado.

4.4 Análises bioquímicas

4.4.1 Glutationa total

Para a dosagem dos níveis de tióis não-proteicos as amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas em ácido percloroacético (PCA) 0,5% (1:10 w/w) e centrifugadas a 15000 x g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, retirou-se uma alíquota do sobrenadante à qual foi diluída 10 x em tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0 (1:10). Para a avaliação do conteúdo intracelular de glutathione total (GSH-t), os níveis de tióis não-proteicos foram determinados através do método enzimático de (TIETZE, 1969). O valor foi expresso como $\mu\text{mol/g}$ tecido fresco.

4.4.2 Atividade enzimática

Para a medição das atividades enzimáticas, as amostras foram homogeneizadas em solução HEPES 20 mM, pH 7,0 (1:10) com a ajuda de um pistilo e centrifugadas a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para as determinações das atividades enzimáticas.

A enzima glutationa redutase (GR) catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática, seguindo a metodologia de (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 100 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NADPH 0,225 mM. Sem adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi descontado das leituras.

A atividade glioxalase foi medida através da formação de S-D-lactoilglutationa (ALLEN; THORNALLEY, 1993). Para formação do substrato da glioxalase 1, o hemitioacetal. GSH 100 mM e MG 100 mM, foram incubados em tampão fosfato 50 mM, pH 6,6, a 37° C por 10 minutos. Uma alíquota desta solução foi acrescentado ao mesmo tampão gerando um meio de reação contendo 2 mM de GSH e MG. A este meio de reação foi adicionada a amostra e a absorbância foi lida em espectrofotômetro durante 1-5 minutos, em 240 nm. A taxa de formação de S-D-lactoilglutationa expressa a atividade glioxalase e foi expresso como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

A tiorredoxina redutase (TrxR) é responsável pela redução da tiorredoxina para seu estado tiólico. Este método se baseia na capacidade da tiorredoxina em reduzir o ácido 55'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), formando o composto ácido 5'-tionitrobenzóico, que pode ser medido em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 412 nm (HOLMGREN; BJÖRNSTEDT, 1995). As amostras foram adicionadas em tampão fosfato 100 mM pH 7,0, EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e 0,2 mg/mL de BSA. As amostras foram então incubadas a 37° C por 5 minutos até que todos os tióis da amostra reajam com o DTNB. Após esse período a reação foi iniciada com a adição de NADPH 200 μM , e mantida por 5 minutos e a taxa de crescimento da absorbância foi acompanhada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A taxa de reação não-específica do DTNB com tióis presentes na amostra, caracterizando uma atividade basal, foi descontado das leituras. O valor foi expresso como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

A atividade enzimática foi relativizada à concentração de proteína. A dosagem de proteína foi efetuada de acordo com o método de (BRADFORD, 1976), usando a albumina do soro bovino como proteína-padrão.

4.4.3 Western blotting

As amostras foram homogeneizadas em solução HEPES 20mM, pH 7,0 e o sobrenadante foi misturado a tampão de amostra contendo SDS 20%, 5% de beta- mercaptoetanol, fervido a 100 °C por 5 minutos e centrifugado a 15.000 por 5 min.

As amostras de córtex cerebral, hipocampo e estriado foram diluídas em glicerol 10 %, SDS 2,0 %, azul de bromofenol 0,004, %, Tris-HCl 0,106 M, pH 6,85, com 2-mercaptoetanol 5,0 %. As proteínas (20 µg/poço) foram separadas por gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) usando um aparato Mini-protean tetra (Bio-Rad, São Paulo). A eletroforese foi realizada com uma voltagem fixa de 200 volts por 50 minutos, ou até o corante ter alcançado o final do gel. Após a separação eletroforética, as proteínas foram eléto-transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF com o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad, São Paulo), por 60 minutos a 100 volts constantes e sob-refrigeração. As membranas foram então bloqueadas com leite desnatado 5,0 % e incubadas *overnight* com anticorpos primários contra Glo1, GCL ou TrxR. Após a incubação por 1 hora sob agitação com anticorpo secundário ligado a peroxidase (1:10000), a revelação foi feita com uma solução quimioluminescente seguida da exposição em filme radiográfico ou em aparelho de fotodocumentação de membranas ChemiDoc MP (Bio-Rad®). A intensidade das bandas foi normalizada por marcação de proteínas totais com Ponceau-S.

4.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média + erro-padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se do teste "t" de Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da administração de metilglioxal sobre o comportamento tipo-depressivo

A figura 5A mostra o resultado referente a avaliação do efeito tipo-depressivo do metilglioxal no TSC, no protocolo experimental de 15 minutos. Uma curva dose-resposta com o metilglioxal foi realizada. Os resultados demonstram que nas doses de 25 mg/kg \rightarrow [$F_{(11, 11)} = 1.124$; $P < 0,001$], 50 mg/kg \rightarrow [$F_{(11, 13)} = 1.459$; $P < 0,05$], 100 mg/kg \rightarrow [$F_{(5, 11)} = 1.716$; $P < 0,001$] e 200 mg/kg \rightarrow [$F_{(5, 11)} = 1.510$; $P < 0,001$] mg/kg houve a alteração do tempo de imobilidade, aumentando este parâmetro de forma significativa, caracterizando um efeito do tipo-depressivo no teste de suspensão pela cauda. Este efeito tipo-depressivo não é atribuído a uma alteração dos parâmetros locomotores nas doses de 10 e 25 mg/kg (Figura 6A e D). Dentre as doses citadas acima, as doses de 10 e 25 mg/kg foram selecionadas para a continuidade dos experimentos.

Na Figura 5B e C, os camundongos também foram submetidos ao TSC no protocolo de 4 horas e de administrações repetidas, respectivamente. Os resultados demonstram que a administração de MG no protocolo de 4 horas, em ambas as doses (10 mg/kg \rightarrow [$F_{(10,9)} = 2.494$; $P < 0.01$] e 25 mg/kg \rightarrow [$F_{(10, 9)} = 4.131$; $P < 0,05$] mg/kg), aumentaram de forma significativa o tempo de imobilidade, e não demonstraram alterações dos parâmetros locomotores no TCA executado no mesmo protocolo (Figura 6B e E).

Na figura 5C, os camundongos foram submetidos ao TSC no protocolo de administrações repetidas, onde foram realizadas administrações diárias de MG, nas doses definidas anteriormente (10 mg/kg \rightarrow [$F_{(5,5)} = 1.758$; $P < 0.05$] e 25 mg/kg \rightarrow [$F_{(5,5)} = 1.809$; $P < 0.001$] mg/kg), por 6 dias consecutivos, caracterizando um tratamento sub-crônico. Os resultados demonstram que as administrações de MG por dias consecutivos aumentaram o tempo de imobilidade, sem alterar os parâmetros locomotores no TCA (Figura 6C e F).

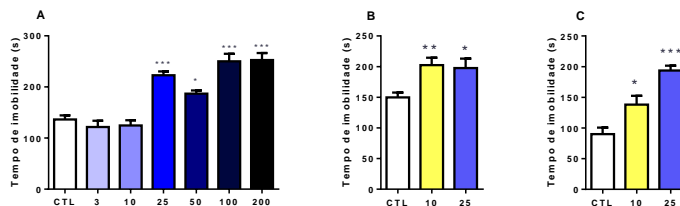


Figura 5. Efeito da administração de metilglíoxal no tempo de imobilidade no TSC. Efeito da administração de MG no tempo de imobilidade referente ao protocolo de 15 minutos (A), 4 horas. (B), e doses repetidas (C; injeções diárias por 6 dias e TSC realizado 24 h após a última dose). Cada coluna representa média + EPM, n = 10. *P<0,05, **P<0.01 e ***P<0,001, comparado com o grupo controle tratado com salina.

5.2 Efeitos da administração de metilglíoxal sobre a atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso

O número de entradas no centro (Fig. 6G-I) e o tempo na área central (Fig. 6J-L) no TCA são parâmetros frequentemente associados a ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Quanto ao número de entradas na área central do TCA (Figura 6G-I), o teste estatístico ANOVA não demonstrou diferença estatística 15 min (Fig. 6G) ou 4 h (Fig. 6H) após a injeção de MG. Também não houve alteração no número de entradas na área central do TCA no protocolo de doses repetidas (Fig. 6I). Quanto ao tempo de permanência na área central no TCA (Fig. 6J-L), não houve diferença estatística em relação ao grupo controle 15 min após a injeção de MG (Fig. 6J), nem no protocolo experimental de doses repetidas (Figura 6L) nas doses de MG testadas (10 e 25 mg/kg).

Interessantemente, 4h após a injeção de MG (Fig. 6K) houve aumento significativo do tempo na área central do campo aberto na dose 10 mg/kg [$F_{(5,5)} = 3.085$; $P < 0,05$], quando comparado com o grupo controle. Este resultado indica que o MG foi capaz de induzir um efeito ansiolítico na dose de 10 mg/kg, mas não na dose de 25 mg/kg.

A Figura 7 apresenta o mapa tigotático de exploração no TCA, no qual, a partir do espectro da luz visível podemos visualizar o local na arena onde o animal permanece por mais tempo. Nessas representações de cores podemos visualizar uma quantidade maior de pixels das cores mais quentes na área central do grupo de 10 mg/kg quando comparado

ao grupo controle, indicando de forma ilustrativa, uma maior permanência do animal na área central do TCA nos tempos de 15 min (Fig. 7B) e 4 h (Fig. 7E) após a injeção de MG, mas não na dose de 25 mg/kg (Fig. 7C, F e H).

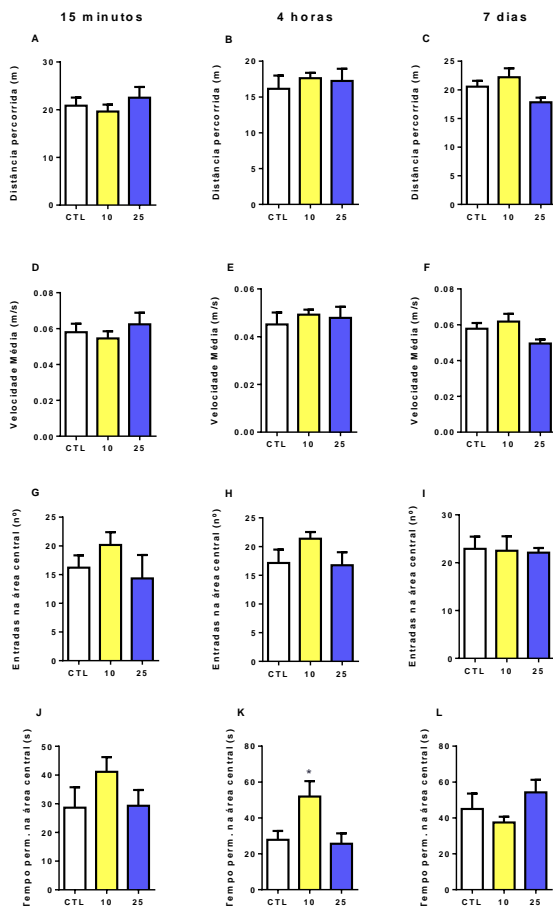


Figura 6. Efeito da administração de metilglioxal sobre a ansiedade e atividade locomotora no TCA. (A-C) Distância percorrida; (D-F) Velocidade média; (G-I) Entradas na área central; (J-L) Tempo na área central. Os efeitos da administração de MG foram avaliados após 15 minutos (coluna esquerda) ou 4 horas (coluna central), ou após doses repetidas (coluna direita) injeções diárias por 6 dias e TCA realizado 24 h após a última dose. Cada coluna representa média + EPM, n = 10. Diferença estatística (* $P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

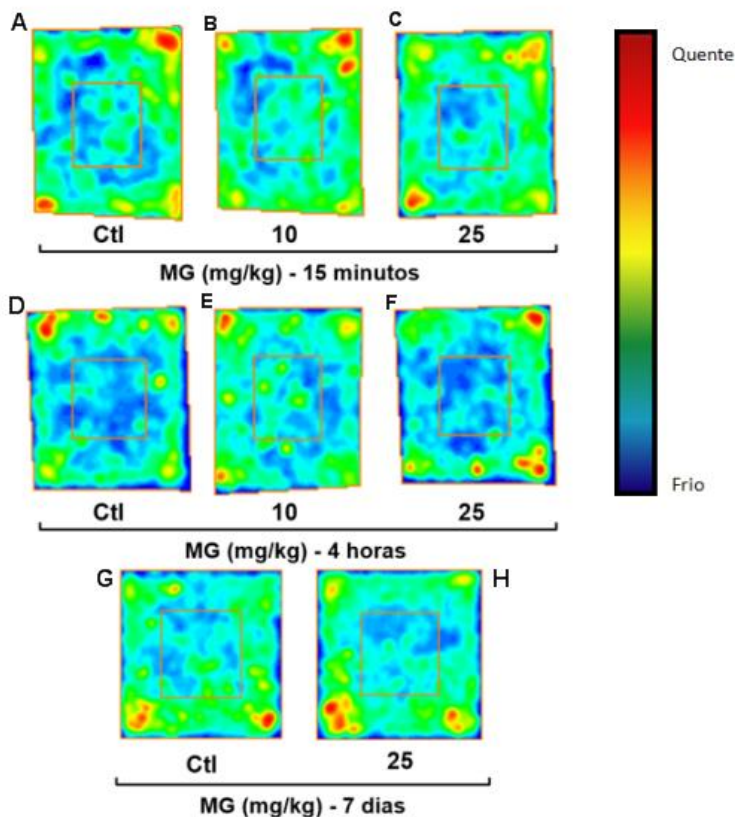


Figura 7. Efeito da administração de metilglioal no mapa de exploração tigmotáxico no TCA. Efeito da administração de MG referente ao protocolo de 15 minutos (A-C), 4 horas (D-F) ou doses repetidas (G e H). As cores mais quentes representam um maior tempo permanecido no local ilustrado, conforme legenda. Cada mapa exploratório representa a exploração média do grupo [n = 10].

A Figura 8 mostra os resultados referentes ao TC/E. Foram avaliados o número de transições entre os compartimentos (8A-C), o tempo permanecido no compartimento claro (8D-F) e a latência para a entrada no compartimento escuro (8G-I).

No número de transições entre o compartimento claro e escuro (Figura 8A, B e C), os animais tratados com MG na dose de 25 mg/kg, no protocolo de administrações repetidas (Figura 8C) demonstram um

aumento no número de transições [$F_{(7, 6)} = 1.122$; $P < 0.05$] de forma significativa. Quanto ao tempo permanecido no compartimento claro (Figura 8D, E e F), os animais administrados MG na dose de 25 mg/kg, no protocolo de administrações repetidas (Figura 8F) demonstram um aumento no tempo permanecido no compartimento claro [$F_{(6, 7)} = 5.322$; $P < 0,05$].

Ainda, nas figuras 8G, H e I, o parâmetro indicado - latência para entrada no compartimento escuro, não demonstra diferenças significativas em nenhuma das doses administradas, assim como, para os diferentes protocolos experimentais.

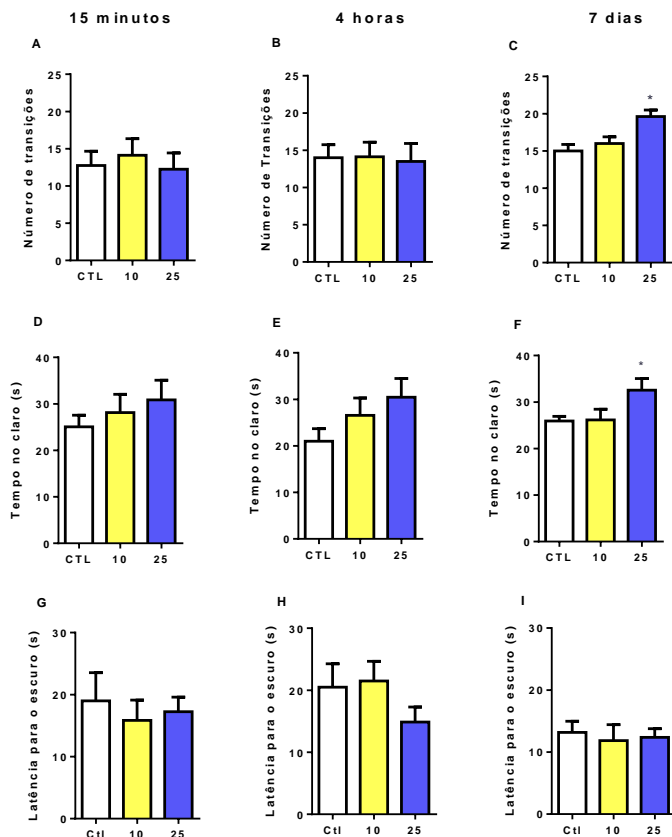


Figura 8. Efeito da administração de metilglioxal sobre os parâmetros comportamentais no teste da caixa claro/escuro (TC/E). Efeito da administração de MG referente ao protocolo de 15 minutos (A, D e G); 4h (B, E e H) e doses repetidas (C, F e I). Cada coluna representa média + EPM, $n = 8$. Diferença estatística (* $P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle, detectado pelo teste t de Student.

5.3 Efeitos da administração de metilglioal sobre as defesas antioxidantes

A Figura 9 mostra que 4 h após a injeção de MG 0, 10 ou 25 mg/kg, os níveis de GSH-t não foram alterados nas três estruturas cerebrais analisadas: (A) córtex cerebral, (B) hipocampo ou (C) estriado.

As atividades enzimáticas foram analisadas em estruturas cerebrais de camundongos tratados com MG 0, 10 ou 25 mg/kg por 4 horas (Fig. 10). As atividades Glo1 (Fig. 10A-C), GR (Fig. 10D-F) e TrxR (Fig. 10G-I) foram analisadas no córtex cerebral (Fig. 10A, D e G), hipocampo (Fig. 10B, E, H), e estriado (Fig. 10C, F e I). Nenhuma alteração foi observada nas atividades Glo1 e GR em nenhuma das regiões cerebrais estudadas, porém, a atividade da TrxR do hipocampo foi aumentada de forma significativa pelo tratamento com MG na dose de 10 mg/kg [$F_{(4, 4)} = 1.436$; $P < 0.01$] (Fig. 10H).

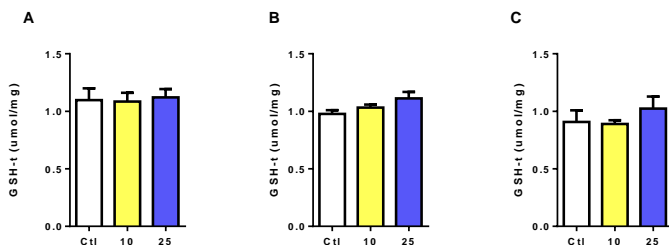


Figura 9. Efeito da administração de metilglioal sobre os níveis de GSH-t no córtex cerebral, hipocampo e estriado. Resultados referentes a 4 horas após a administração i.p. de MG nas doses de 0 (Ctl), 10 e 25 mg/kg. (A) Córtex cerebral; (B) Hipocampo; (C) Estriado. Cada coluna representa média + EPM, N = 5.

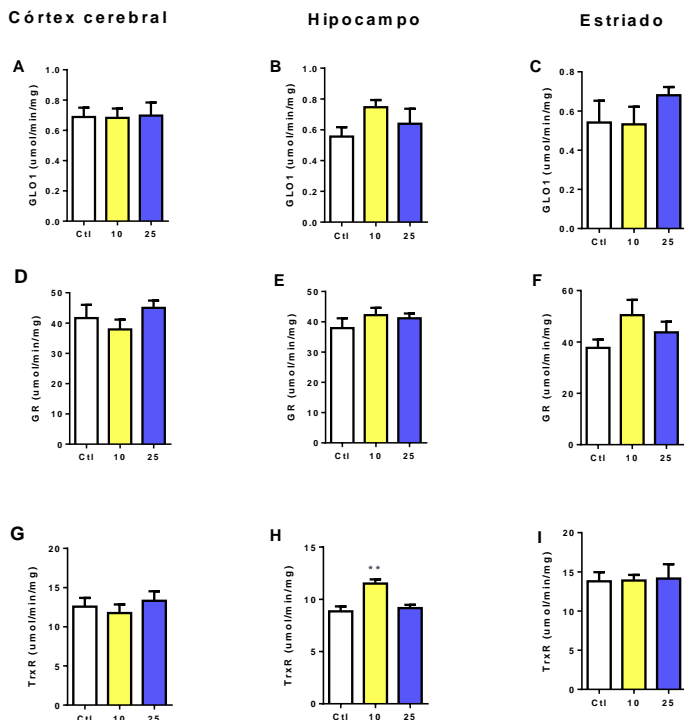


Figura 10. Efeito da administração de metilglioxal sobre a atividade enzimática Glo1, GR e TrxR nas estruturas cerebrais: córtex cerebral, hipocampo e estriado. Resultados referentes a 4 horas após a administração i.p. de MG nas doses de 10 e 25 mg/kg. Atividades das enzimas glicoxalase 1 (Glo1; A-C, GR (E-F) e TrxR (G-I) nas diferentes estruturas cerebrais: Córtex cerebral (coluna da esquerda), hipocampo (coluna central) e estriado (coluna da direita). Cada coluna representa média + EPM; N = 5. Diferença significativa (**P<0,01), quando comparado ao grupo controle.

O presente estudo investigou o efeito da administração de MG sobre a expressão de Glo1, GCL e TrxR por meio da técnica de *Western blotting* (Fig.11). As seguintes estruturas cerebrais: córtex cerebral (Fig. 11A, D e G), hipocampo (Fig. 12B, E e H) e estriado (Fig. 11C, F e I) foram analisadas. A expressão das enzimas Glo1, GCL e TrxR não

foram alteradas 4 horas após o tratamento com MG 10 ou 25 mg/kg, nas três regiões estudadas, quando comparadas ao grupo controle (Fig. 11).

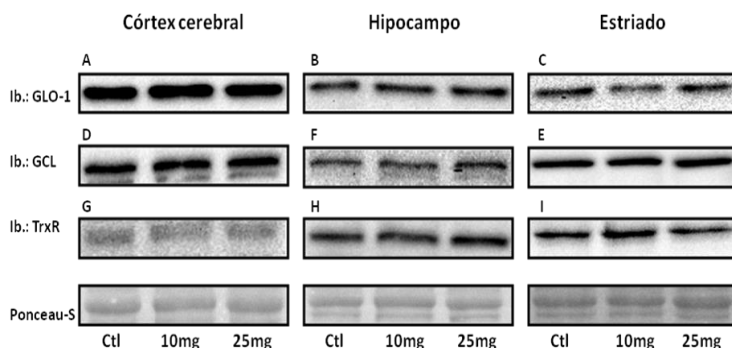


Figura 11. Expressão relativa das enzimas Glo1, GCL e TrxR no córtex cerebral, hipocampo e estriado 4 h após administração de metilglioxal 10 ou 25 mg/kg. Glo1 (A-C), GCL (D-F) e TrxR (G-I) no córtex cerebral (A, D e G), hipocampo (B, F e H) e estriado (C, E e I). A intensidade das bandas foi normalizada por marcação com Ponceau-S. Cada coluna representa média + EPM, N = 3.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a administração de MG induz a um comportamento tipo-depressivo no TSC, nos protocolos experimentais de administração aguda (15 min e 4h após a administração) e em doses repetidas (6 dias). Um efeito ansiolítico foi observado no TCA no protocolo de 4 horas quando os animais foram tratados com MG 10 mg/kg. Este comportamento ansiolítico também foi observado no TC/E, tanto em 4 horas como em doses repetidas de 25 mg/kg. A maior permanência no centro do campo aberto também pode ser observada visualmente com um mapeamento tigmotático. Por fim, as análises bioquímicas mostram aumento na atividade da TrxR na região do hipocampo em animais tratados com MG.

Os animais submetidos ao protocolo experimental de 15 minutos, no teste de suspensão pela cauda, foram tratados com uma ampla faixa de concentrações de MG (3 a 200 mg/kg), caracterizando uma curva dose-resposta. A partir da dose de 25 mg/kg, os animais apresentam o comportamento tipo-depressivo, indicado pelo aumento no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, efeito que se mantém e se torna mais notável, conforme o aumento da dose administrada. A fim de validar se o aumento do tempo de imobilidade, apresentado pelos animais tratados com MG, foi devido a uma alteração na atividade locomotora, foi realizado o TCA. O TCA demonstrou que nas doses de 10 e 25 mg/kg não houve alteração na atividade locomotora dos animais. Este dado indica que o aumento no tempo de imobilidade representa especificamente um comportamento tipo-depressivo. Uma vez estabelecido, as doses de 10 e 25 mg/kg foram selecionadas para dar continuidade às avaliações comportamentais. Confirmando os dados anteriores (de 15 minutos), 4 horas após e 6 dias após tratamento com MG também houve aumento significativamente do tempo de imobilidade no TSC, o qual não foi causado por uma diminuição da atividade locomotora.

O aumento no tempo de imobilidade, é um resultado contraditório a um estudo anterior (BENTON et al., 2012). Neste estudo, os animais que apresentaram níveis aumentados de Glo1, supostamente apresentando diminuição nos níveis de MG, exibiram comportamento tipo-depressivo. E, ainda, os dados apresentados por Hambsch e colaboradores (HAMBSCH et al., 2010), demonstraram uma diminuição do tempo de imobilidade, caracterizando um efeito tipo-

antidepressivo, nos animais que receberam a administração de MG (0,7 μ mol/sítio, i.c.v. por infusão) por 6 dias consecutivos.

É importante ressaltar que a associação entre a expressão de Glo1 e os comportamentos relacionados a depressão tem recebido pouca atenção se comparados aos estudos relacionados a ansiedade. Não existem estudos focando somente na ação tipo-antidepressiva/tipo-depressiva de MG ou da Glo1. Modelos animais utilizados para a ansiedade demonstraram alterações na atividade locomotora, o que pode ser um viés em potencial na interpretação dos dados sobre o teste do nado forçado e TSC. Por exemplo, o tempo de imobilidade no teste do nado forçado é extremamente baixo em camundongos de comportamento ansioso diminuído, quando comparado a linhagens mais ansiosas (KRÖMER et al., 2005b). Contudo, a atividade ambulatoria espontânea foi dez vezes maior na linhagem de camundongos menos ansiosos, o que pode explicar o "efeito antidepressivo" aparente apresentado no TSC (HAMBSCH et al., 2010).

Estudos recentes de eletrofisiologia com neurônios primários, identificaram o MG como um agonista competitivo parcial de receptores GABA_A. Ainda, os mesmos autores caracterizaram que em doses baixas o MG é capaz de induzir um efeito ansiolítico, enquanto que em doses altas o MG induz déficit locomotor, ataxia e hipotermia, efeitos semelhantes ao de outros ativadores de receptores GABA_A. De tal forma, seu efeito ansiolítico parece ser dependente da ativação da neurotransmissão gabaérgica (DISTLER et al., 2012).

Analizando o comportamento dos animais no TCA, no protocolo experimental de 4 horas e doses repetidas, pode ser observado que a administração de MG 10 mg/kg levou a um aumento do tempo permanecido na área central no protocolo de 4 horas, o que é considerado um efeito ansiolítico. De forma interessante, os animais que receberam as administrações repetidas de MG não mostram uma maior permanência na área central, indicando que administrações repetidas de MG não são capazes de induzir um efeito ansiolítico, neste modelo.

O MG foi caracterizado como um agonista de receptor GABA_A (DISTLER et al., 2012) e a administração constante de MG pode levar o receptor GABA_A a uma dessensibilização e diminuição na capacidade do MG de se ligar ao receptor e exercer seu efeito ansiolítico, mecanismo conhecido como tolerância. A tolerância é considerada como um mecanismo neuronal adaptativo, e que pode prevenir um dano ao sistema nervoso central causado por uma ativação constante de uma via de neurotransmissão (VINKERS; OLIVIER, 2012). Na tolerância, a

ativação constante de um receptor levará a uma diminuição na eficácia da substância em se ligar ao receptor, neste caso, impedindo que ocorra a ativação de receptores GABA_A. Tal mecanismo têm sido observado com outros compostos com efeito ansiolítico, como os BDZ, que se utilizados de forma crônica, podem deixar de exercer seu efeito (ISHIHARA et al., 1993).

Referente aos parâmetros relacionados ao comportamento ansioso no TC/E, no protocolo experimental de 4 horas e administrações repetidas - tempo permanecido no compartimento claro e número de transições, os animais tratados com MG na dose de 25 mg/kg, demonstram um aumento significativo no tempo permanecido no compartimento claro e no número de transições entre os compartimentos, sendo tais áreas consideradas, em geral, aversivas pelo animal (BOURIN; HASCOËT, 2003). Este dado indica um possível efeito ansiolítico de MG. Em concordância com resultados anteriores (HAMBSCH et al., 2010). Neste último estudo foi utilizado um protocolo análogo em regime de 6 dias, porém, administrando MG via i.c.v. (0,7 µmol). Neste trabalho, os resultados do TC/E sugere um efeito ansiolítico do MG, mas em discordância com a ausência de efeito no TCA. Sugerindo que mais estudos sejam realizados para confirma o efeito ansiolítico de injeções i.p. de MG, uma vez que somente injeções i.c.v. foram relatadas na literatura

A presença de um possível efeito ansiolítico de MG já é discutida na literatura por (HAMBSCH et al., 2010), demonstrando que a administração i.c.v. de MG apresenta uma diminuição do comportamento ansioso no teste do labirinto em cruz-elevada. Estudos semelhantes que focam no aumento da expressão e atividade Glo1, além da modulação dos níveis de MG, também apresentam resultados similares (HOVATTA et al., 2005). Animais com nocaute para Glo1 apresentaram um aumento dos níveis de MG no SNC, além de apresentarem diminuição no comportamento ansioso. Ainda, outros autores destacam a associação entre um aumento da expressão de Glo1 ou uma maior atividade de Glo1 e o aumento do comportamento ansioso (BENTON et al., 2012; DISTLER et al., 2012), todos sugerindo um efeito ansiolítico do MG.

Como mencionado anteriormente, diversos autores têm evidenciado a associação entre níveis aumentados de Glo1 ou mesmo aumento na sua atividade enzimática e a modulação do comportamento tipo-depressivo e ansioso. Dessa forma, o presente estudo investigou se a administração de MG seria capaz de induzir alterações na atividade e

expressão da enzima Glo1 em três regiões cerebrais que estão envolvidas na modulação dos comportamentos relacionados à depressão e à ansiedade (córtex, hipocampo e estriado). A administração de MG não resultou na alteração da atividade enzimática de Glo1 em nenhuma das regiões cerebrais estudadas. Outros autores demonstraram um aumento significativo na atividade de Glo1 no hipocampo de animais tratados com MG (HANSEN et al., 2016). Ainda, analisamos a expressão da Glo1 em resposta a administração de MG, cujos dados não evidenciaram alterações dos níveis de Glo1 em nenhuma das regiões cerebrais estudadas. Estes dados diferem daqueles encontrados anteriormente com células HT22 (Dafre et al., 2015). Uma possibilidade para explicar esta diferença pode residir na concentração celular. As células foram expostas a 0,3 ou 0,75 mM de MG, enquanto que no estudo in vivo espera-se concentrações muito mais baixas no sangue (~30 uM), e ainda menores no SNC. A medida dos níveis de MG plasmático e no SNC poderiam esclarecer estas dúvidas.

Está bem estabelecido na literatura que altas doses de MG podem levar a uma depleção de GSH, devido a reação espontânea que ocorre entre as duas moléculas (KALAIPOS, 2008b) ou pela alteração de mecanismos que se encontram envolvidos com a síntese de GSH (DAFRE et al., 2015). Rosa e colaboradores (ROSA; DAFRE; RODRIGUES, 2013), demonstram que a administração i.c.v. de GSH produz um efeito tipo-antidepressivo. Efeito que pode ser modulado pelas enzimas envolvidas com o metabolismo da GSH. De tal forma, o efeito tipo-depressivo do MG pode ter envolvimento com a depleção ou diminuição dos níveis de GSH. Desta forma, foram mensurados os níveis de GSH. Uma única administração de MG nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p., não causou alterações significativas nos níveis de GSH-t após 4 h, em nenhuma das regiões cerebrais estudadas. Dados que são contrários aos do estudo realizado por Hansen e colaboradores (HANSEN et al., 2016), onde uma única administração de MG (3 µmol/µl, i.c.v.) levou a diminuição nos níveis de GSH-t no hipocampo de ratos.

Em concentrações elevadas, o MG foi capaz de induzir o fator de transcrição Nrf2, e o consequente aumento na expressão da GCL em células HT22 (DAFRE et al., 2015). Também verificamos se o MG poderia alterar a expressão da enzima GCL, passo limitante da síntese de GSH. Não foram observadas alterações significativas na expressão da GCL em nenhuma das regiões cerebrais estudadas. Este dado é condizente com a ausência de alteração nos níveis de GSH. Entretanto, a

espécie, as doses e as vias de administração são diversas, o que poderia explicar as diferenças nos resultados publicados e os apresentados neste trabalho.

Por fim, a enzima TrxR é uma das enzimas responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox celular (PANNALA; DASH, 2015). Evidências experimentais sugerem que em estados de hiperglicemia e diabetes, onde pode existir o acúmulo de MG, existe também uma diminuição da atividade da TrxR (LI et al., 2005). Da mesma forma, células HT22 tratadas com MG tiveram os níveis da proteína TrxR diminuídos em 5 e 25h, enquanto houve maior expressão da TrxR1 após 24h, potencialmente dependente da ativação do fator de transcrição Nrf2 (DAFRE et al., 2015). Ainda, em um modelo de estresse prolongado em ratos os autores associaram um efeito ansiolítico, demonstrado pelo aumento no número de entradas e tempo permanecido nos braços abertos do teste do labirinto em cruz-elevada, ao aumento dos níveis de TrxR, após os animais serem condicionados a uma câmara hiperbárica de oxigênio (PENG et al., 2010). De forma interessante, após uma única administração de MG, houve o aumento de forma significativa da atividade enzimática de TrxR1, somente na região do hipocampo, na dose de 10 mg/kg. Contudo, a expressão da TrxR1 não foi alterada de forma significativa. São necessários novos experimentos para esclarecer os mecanismos relacionados a esta alteração na atividade TrxR.

O conjunto dos dados, juntamente com aqueles apresentados por outros autores, confirmam que o MG está envolvido com a modulação de comportamentos relacionados a depressão e a ansiedade em roedores, exibindo um efeito tipo-depressivo e um efeito ansiolítico. Ainda seria importante investigar mais a fundo o envolvimento e o real impacto do MG sobre o comportamento, analisando por exemplo, quais seriam os sistemas de neurotransmissão que estariam potencialmente envolvidas com o efeito tipo-depressivo e ansiolítico do MG. Merece destaque o sistema gabaérgico devido a caracterização do MG como agonista parcial competitivo de receptores GABA_A (DISTLER et al., 2012).

Já foi demonstrado que o MG é capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células astrocitárias (DITNC1), e *in vivo* no hipocampo (CHU et al., 2016). Desta forma, seria interessante saber se nos protocolos de administração de MG apresentados neste estudo há uma maior liberação de citocinas inflamatórias, uma vez que estas estão envolvidas com o desenvolvimento da depressão e ansiedade.

Dentre os alvos bioquímicos do MG está o sistema das glioxalases, o sistema da Trx/TrxR, tióis não proteicos (GSH) e proteicos, além da ativação do fator de transcrição Nrf2, e consequente indução de defesas antioxidantes (DAFRE et al., 2015). Neste sentido, seria interessante estender estes estudos para o protocolo de doses repetidas e verificar se estas alterações estariam presentes *in vivo*.

7 PERSPECTIVAS

Alguns aspectos relacionados a este trabalho ainda precisam ser melhor estudados:

- Analisar outros efeitos comportamentais após o tratamento com MG, assim como, a utilização de outros modelos de depressão.
- Investigação das vias de neurotransmissão envolvidas no efeito tipo-depressivo e ansiolítico do MG através de manipulação farmacológica.
- Utilizar de tratamentos crônicos para evidenciar possíveis alterações neuroquímicas induzidas pelo MG.
- Considerando, também, que o estresse oxidativo está envolvido com o desenvolvimento da depressão, analisar a formação de espécies reativas de oxigênio, assim como, o aumento da peroxidação lipídica.
- Analisar um possível perfil inflamatório, visto que o estresse oxidativo pode induzir a formação de citocinas pró-inflamatórias, e que a inflamação está correlacionada com a depressão.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALLEN, R. E.; THORNALLEY, P. J. Simple chromatographic methods for the purification of human red blood cell glyoxalase I and glyoxalase II to homogeneity. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 2, p. 171S, maio 1993.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, 5th ed, Washington, DC, 2013. [s.l: s.n.].

ANDERSON, R. J. et al. The Prevalence of Comorbid Depression in Adults With Diabetes A meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 24, n. 6, p. 1069–1078, 1 jun. 2001.

ARNÉR, E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 6, p. 495–526, jun. 2009.

BALDWIN, D. S.; WALDMAN, S.; ALLGULANDER, C. Evidence-based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 14, n. 5, p. 697–710, jun. 2011.

BEERI, M. S. et al. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 11–12, p. 583–587, nov. 2011.

BEISSWENGER, P. J. et al. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 198–202, jan. 1999.

BENTON, C. S. et al. Evaluating genetic markers and neurobiochemical analytes for fluoxetine response using a panel of mouse inbred strains. **Psychopharmacology**, v. 221, n. 2, p. 297–315, maio 2012.

BERMAN, R. M.; NARASIMHAN, M.; CHARNEY, D. S. Treatment-refractory depression: definitions and characteristics. **Depression and Anxiety**, v. 5, n. 4, p. 154–164, 1997.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. H1227–1236, mar. 2007.

BIRKENHÄGER, T. K.; MOLEMAN, P.; NOLEN, W. A. Benzodiazepines for depression? A review of the literature. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 181–195, set. 1995.

BOING, A. F. et al. Association between depression and chronic diseases: results from a population-based study. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 4, p. 617–623, ago. 2012.

BOURIN, M. et al. A schematic representation of the psychopharmacological profile of antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 20, n. 8, p. 1389–1402, nov. 1996.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology, Animal Models of Anxiety Disorders**. v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 28 fev. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRANCHI, I. et al. Antidepressant Treatment Outcome Depends on the Quality of the Living Environment: A Pre-Clinical Investigation in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 30 abr. 2013.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 13 dez. 2001.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CHOUDARY, P. V. et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15653–15658, 25 out. 2005.

CHU, J. M. T. et al. Methylglyoxal-induced neuroinflammatory response in in vitro astrocytic cultures and hippocampus of experimental animals. **Metabolic Brain Disease**, 2 jun. 2016.

COLLINS, J. A. et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) promote hyperoxidation of peroxiredoxins and inhibit pro-survival IGF-1 signaling in human articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, p. A32–A33, 1 abr. 2015.

COPPEN, A. J.; DOOGAN, D. P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 49 Suppl, p. 4–11, ago. 1988.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, ago. 1980.

CRYAN, J. F.; KAUPMANN, K. Don't worry "B" happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 36–43, jan. 2005.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 1 maio 2002.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. Animal models of mood disorders: Recent developments. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 1–7, jan. 2007.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. GABAB Receptors and Depression: Current Status. In: BLACKBURN, T. P. (Ed.). . **Advances**

in Pharmacology. GABABReceptor PharmacologyA Tribute to Norman Bowery. [s.l.] Academic Press, 2010. v. 58p. 427–451.

DAFRE, A. L. et al. Methylglyoxal, the foe and friend of glyoxalase and Trx/TrxR systems in HT22 nerve cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 89, p. 8–19, dez. 2015.

DELL'OSSO, B. et al. Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. **Human Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 17–29, jan. 2010.

DISTLER, M. G. et al. Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2306–2315, 1 jun. 2012.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435–451, maio 2004.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D.; THURAS, P. D. Deficits in GABA(B) receptor system in schizophrenia and mood disorders: a postmortem study. **Schizophrenia Research**, v. 128, n. 1–3, p. 37–43, maio 2011.

FINEBERG, N. A. et al. Manifesto for a European research network into obsessive-compulsive and related disorders. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 7, p. 561–568, jul. 2013.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, abr. 2009.

FUJIMOTO, M. et al. Reduced expression of glyoxalase-1 mRNA in mood disorder patients. **Neuroscience Letters**, v. 438, n. 2, p. 196–199, 20 jun. 2008.

FULLER, R. W. Pharmacology of central serotonin neurons. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 111–127, 1980.

GAVARD, J. A.; LUSTMAN, P. J.; CLOUSE, R. E. Prevalence of depression in adults with diabetes. An epidemiological evaluation. **Diabetes Care**, v. 16, n. 8, p. 1167–1178, ago. 1993.

GOLD, B. I. et al. GABA levels in CSF of patients with psychiatric disorders. **The American Journal of Psychiatry**, v. 137, n. 3, p. 362–364, mar. 1980.

GÖREN, M. Z. et al. Fluoxetine partly exerts its actions through GABA: a neurochemical evidence. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 9, p. 1559–1565, set. 2007.

HALL, H. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, v. 22, n. 3, p. 345–352, 1936.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, jun. 2006.

HAMBSCH, B. et al. Methylglyoxal-mediated anxiolysis involves increased protein modification and elevated expression of glyoxalase 1 in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 5, p. 1240–1251, jun. 2010.

HANSEN, F. et al. Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. **Physiology & Behavior**, v. 164, n. Pt A, p. 93–101, 1 out. 2016.

HASLER, G. PATHOPHYSIOLOGY OF DEPRESSION: DO WE HAVE ANY SOLID EVIDENCE OF INTEREST TO CLINICIANS? **World Psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 155–161, out. 2010.

HOFFMAN, D. L.; DUKES, E. M.; WITTCHEN, H.-U. Human and economic burden of generalized anxiety disorder. **Depression and Anxiety**, v. 25, n. 1, p. 72–90, 2008.

HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 252, p. 199–208, 1995.

HOVATTA, I. et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 662–666, 1 dez. 2005.

HUNTER, R. M. et al. Modelling the cost-effectiveness of preventing major depression in general practice patients. **Psychological Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1381–1390, maio 2014.

ISHIHARA, S. et al. Development of tolerance to anxiolytic effects of chlordiazepoxide in elevated plus-maze test and decrease of GABAA receptors. **Journal of Neural Transmission. General Section**, v. 91, n. 1, p. 27–37, 1993.

JACK, M.; WRIGHT, D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. **Translational Research**, v. 159, n. 5, p. 355–365, maio 2012.

KALAPOS, M. P. Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicology Letters**, v. 110, n. 3, p. 145–175, 22 nov. 1999.

KALAPOS, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 251–271, 15 fev. 2008a.

KALAPOS, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 251–271, 15 fev. 2008b.

KALAPOS, M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 3, p. 260–271, mar. 2013.

KIRKPATRICK, D. et al. Paradoxical Reaction to Alprazolam in an Elderly Woman with a History of Anxiety, Mood Disorders, and Hypothyroidism. **Case Reports in Psychiatry**, v. 2016, 2016.

KRÖMER, S. A. et al. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4375–4384, 27 abr. 2005a.

KRÖMER, S. A. et al. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4375–4384, 27 abr. 2005b.

KUHAR, M. J.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D. Biosynthesis of Catecholamines. 1999.

KUHLA, B. et al. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 211–216, jun. 2005.

LAMERS, F. et al. Comorbidity patterns of anxiety and depressive disorders in a large cohort study: the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 341–348, mar. 2011.

LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n. 3, p. 137–159, dez. 2000.

LI, X. et al. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 3, p. H1417-1424, mar. 2005.

LYDIARD, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64 Suppl 3, p. 21–27, 2003.

LYLES, G. A.; CHALMERS, J. The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1409–1414, 1 abr. 1992.

MANN, J. J. et al. Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. **The American Journal of Psychiatry**, v. 153, n. 2, p. 174–182, fev. 1996.

MANTOVANI, M. et al. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-d-aspartate receptors and the l-arginine-nitric oxide pathway. **Neuroscience Letters**, v. 343, n. 1, p. 1–4, 29 maio 2003.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, out. 2005.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 11, nov. 2006.

MCMURRAY, K. M. J. et al. Neuronal overexpression of Glo1 or amygdalar microinjection of methylglyoxal is sufficient to regulate anxiety-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 119–123, 15 mar. 2016.

MEHTA, D.; MENKE, A.; BINDER, E. B. Gene Expression Studies in Major Depression. **Current Psychiatry Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–144, abr. 2010.

MICHEL, T. M.; PÜLSCHEN, D.; THOME, J. The role of oxidative stress in depressive disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 36, p. 5890–5899, 2012.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, Anxiety and Depression. v. 62, n. 1, p. 42–53, jan. 2012.

NARDI, A. E. Depressão no Ciclo da Vida. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 3, p. 151–152, set. 2000.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 3–4, p. 189–206, abr. 2007.

OBA, T. et al. Methylglyoxal has deleterious effects on thioredoxin in human aortic endothelial cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 117–126, set. 2012.

ORDWAY, G. A. et al. Quantitative distribution of monoamine oxidase A in brainstem monoamine nuclei is normal in major depression. **Brain Research**, v. 847, n. 1, p. 71–79, 13 nov. 1999.

OROSZ, F.; OLÁH, J.; OVÁDI, J. Triosephosphate isomerase deficiency: New insights into an enigmatic disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Mitochondrial Disease. v. 1792, n. 12, p. 1168–1174, dez. 2009.

PANNALA, V. R.; DASH, R. K. Mechanistic characterization of the thioredoxin system in the removal of hydrogen peroxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 78, p. 42–55, jan. 2015.

PARKER, G.; FLETCHER, K.; HADZI-PAVLOVIC, D. Is context everything to the definition of clinical depression? A test of the Horwitz and Wakefield postulate. **Journal of Affective Disorders**, v. 136, n. 3, p. 1034–1038, fev. 2012.

PATKI, G. et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Research**, v. 1539, p. 73–86, 20 nov. 2013.

PEHRSON, A. L.; SANCHEZ, C. Altered γ -aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of the supporting evidence and the influence of serotonergic antidepressants. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 603–624, 19 jan. 2015.

PENG, Y. et al. Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates anxiety-like behavior and cognitive impairments via upregulation of thioredoxin reductases in stressed rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1018–1025, 16 ago. 2010.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245–255, jan. 2005.

PHILLIPS, S. A.; MIRRLEES, D.; THORNALLEY, P. J. Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats: Effect of the aldose reductase inhibitor statil. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 805–811, 1 set. 1993.

POOLE, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 80, p. 148–157, mar. 2015.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327–336, out. 1977.

POST, R. M. et al. Lack of beneficial effects of l-baclofen in affective disorder. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 6, n. 4, p. 197–207, 1991.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, Animal Models of Anxiety Disorders. v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 28 fev. 2003.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. **Amino Acids**, v. 42, n. 4, p. 1133–1142, abr. 2012.

REICHARD, G. A. et al. Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. **Diabetes**, v. 35, n. 6, p. 668–674, jun. 1986.

ROSA, J. M.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 165–172, 15 set. 2013.

ROSENBLAT, J. D. et al. Beyond Monoamines-Novel Targets for Treatment-Resistant Depression: A Comprehensive Review. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 636–655, 2015.

ROSSI, A.; BARRACO, A.; DONDA, P. Fluoxetine: a review on evidence based medicine. **Annals of General Hospital Psychiatry**, v. 3, p. 2, 12 fev. 2004.

ROTELLA, F.; MANNUCCI, E. Depression as a risk factor for diabetes: a meta-analysis of longitudinal studies. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 74, n. 1, p. 31–37, jan. 2013.

SANACORA, G. et al. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. **The American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 4, p. 663–665, abr. 2002.

SANACORA, G. et al. Increased cortical GABA concentrations in depressed patients receiving ECT. **The American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 3, p. 577–579, mar. 2003.

SANTOS, É. G. DOS; SIQUEIRA, M. M. DE. Prevalence of mental disorders in the Brazilian adult population: a systematic review from 1997 to 2009. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 3, p. 238–246, 2010.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, nov. 1965.

SEQUEIRA, A. et al. Global Brain Gene Expression Analysis Links Glutamatergic and GABAergic Alterations to Suicide and Major Depression. **PLOS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6585, 11 ago. 2009.

SHALTIEL, G.; CHEN, G.; MANJI, H. K. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Current Opinion in Pharmacology, Neurosciences**, v. 7, n. 1, p. 22–26, fev. 2007.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 12–25, 11 abr. 2006.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

THORNALLEY, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 4, p. 565–573, jun. 1996.

THORNALLEY, P. J. Glycation in diabetic neuropathy: Characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. In: NEUROBIOLOGY, B.-I. R. OF (Ed.). Neurobiology of Diabetic Neuropathy. [s.l.] Academic Press, 2002. v. 50p. 37–57.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, mar. 1969.

VINKERS, C. H.; OLIVIER, B. Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABAA Receptor Modulators? **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2012, 2012.

WHO | Depression. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/>. Acesso em: 29 mar. 2016.

WONG, M.-L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 343–351, maio 2001.

WORLEIN, J. M. Nonhuman Primate Models of Depression: Effects of Early Experience and Stress. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 259–273, 1 jan. 2014.

WU, G. et al. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489–492, 1 mar. 2004.

YAN, L.-J.; YAN, L.-J. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress, Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. **Journal of Diabetes Research, Journal of Diabetes Research**, v. 2014, 2014, p. e137919, 16 jun. 2014.

YANG, Y. et al. Proteomics reveals energy and glutathione metabolic dysregulation in the prefrontal cortex of a rat model of depression. **Neuroscience**, v. 247, p. 191–200, 5 set. 2013.

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 16, n. 4, p. 200–203, ago. 2004.